

In vitro-Untersuchungen zum Einfluss von konjugierten
Linolsäuren auf kultivierte Pansenepithelzellen vom
Schaf als direkt exponiertes Gewebe bei oraler
Supplementierung

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. rer. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

| | |
|----------------------------|---|
| eingereicht von: | Apothekerin Franziska Masur |
| Geburtsdatum / Geburtsort: | 13.02.1987 in Münster |
| angefertigt am: | Rudolf-Schönheimer-Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät, Universität Leipzig Veterinär-Physiologischen Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig |
| Betreuer: | Prof. Dr. med. Torsten Schöneberg Prof. Dr. med. vet. Gotthold Gäbel Prof. Dr. med. vet. Herbert Fuhrmann |

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrads vom: 26.06.2018

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abkürzungsverzeichnis..... | 3 |
| 1 Einleitung | 5 |
| Allgemein | 5 |
| 1.1 CLA-Nomenklatur | 6 |
| 1.2 Bildung von CLAs und deren Vorkommen | 7 |
| 1.3 CLA-Supplementierung beim Rind..... | 9 |
| 1.4 Zu CLAs strukturverwandte Fettsäuren im Pansen | 10 |
| 1.5 Potenzielle Wirkungen von CLAs und strukturverwandten Fettsäuren auf das Pansenepithel..... | 11 |
| 1.5.1 Aufbau und Bedeutung des Pansenepithels | 11 |
| 1.5.2 Resorption von langkettigen Fettsäuren über das Pansenepithel..... | 11 |
| 1.5.3 Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung nach Supplementierung | 11 |
| 1.5.3.1 Metabolisierung..... | 12 |
| 1.5.3.2 SCD und die endogene Synthese von CLA c9t11 | 13 |
| 1.5.4 CLA-Targets im Pansenepithel | 15 |
| 1.5.4.1 SCD | 15 |
| 1.5.4.2 Monocarboxylattransporter..... | 16 |
| 1.5.4.3 PPAR als Transkriptionsfaktor für die SCD und die MCTs | 19 |
| 2 Zielstellung | 21 |
| 3 Originalarbeit..... | 22 |
| 4 Ergänzung zur Originalarbeit..... | 43 |
| 4.1 Nachweis von SCD-mRNA im nativen Pansenepithel des Schafes | 43 |
| Zusammenfassung der Arbeit..... | 44 |
| Literaturverzeichnis | 49 |
| Anhang (Supplemental Material) | 59 |
| Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift..... | 67 |
| Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit | 69 |
| Publikationen und Vorträge im Rahmen der Dissertation..... | 70 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| BCA | Bicinchoninsäure, engl.: bicinchoninic acid |
| BLAST | engl.: basic local alignment search tool |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| c9t11 | CLA C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 |
| cDNA | komplementäre DNA, engl. complementary DNA |
| ChREBP | engl.: carbohydrate-responsive element-binding protein |
| CLA | konjugierte Linolsäure(n), engl.: conjugated linoleic acid(s) |
| c, t | <i>cis</i> , <i>trans</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure, engl.: desoxyribonucleic acid |
| EI | Elongations-Index |
| engl. | englisch |
| FA | Fettsäure(n), engl.: fatty acid(s) |
| FAME | Fettsäuremethylester, engl.: fatty acid methyl ester |
| FBS | fetales Rinderserum, engl.: fetal bovine serum |
| GAPDH | engl.: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [GAPDH] |
| GC | Gaschromatographie, engl.: gas chromatography |
| GC-MS | GC mit Massenspektrometrie-Kopplung |
| HIF-1 α | engl.: hypoxia-inducible factor 1 α |
| IPA | Ingenuity Pathways Analysis |
| LA | Linolsäure (C18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12), engl.: linoleic acid |
| LCFA | langkettige Fettsäure(n), engl. long-chain fatty acid(s) |
| LXR | engl.: liver X receptor |
| MCT | Monocarboxylattransporter, engl.: monocarboxylate transporter [SLC16] |
| MLX | engl.: max-like protein X |
| mRNA | Boten-RNA, engl. messenger RNA |
| MUFA | einfach ungesättigte Fettsäure(n), engl.: monounsaturated fatty acid(s) |
| n | Anzahl der Stichproben |
| N | Anzahl der Tiere |
| NF-Y | engl.: nuclear transcription factor Y |
| NTC | Negativkontrolle, engl.: no template control |
| OA | Ölsäure (C18:1 <i>cis</i> -9), engl.: oleic acid |
| P | Irrtumswahrscheinlichkeit, engl.: probability |

| | |
|----------------|--|
| PCR | Polymerase Kettenreaktion, engl.: polymerase chain reaction |
| PEZ | Pansenepithelzelle(n), siehe auch REC |
| PPAR | engl.: peroxisome proliferator-activated receptor [PPAR] |
| PPRE | engl.: PPAR-response element |
| PUFA | mehrfach ungesättigte Fettsäure(n), engl.: polyunsaturated fatty acid(s) |
| REC | engl.: rumen epithelial cells, siehe auch PEZ |
| REST | engl.: relative expression software tool |
| RNA | Ribonukleinsäure, engl.: ribonucleic acid |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-PCR |
| RT-qPCR | Reverse Transkriptase-Quantitative PCR, engl.: reverse transcription-quantitative PCR |
| RXR | engl.: retinoid X receptor |
| SCD | Stearoyl-CoA-Desaturase oder delta-9-Desaturase, engl.: stearoyl-CoA desaturase [SCD] |
| SCDI | SCD-Index |
| SCFA | kurzkettige Fettsäure(n), engl.: short-chain fatty acid(s) |
| SCFA | Dissoziierte kurzkettige Fettsäuren |
| SFA | gesättigte Fettsäure(n), engl.: saturated fatty acid(s) |
| SREBP-1 | engl.: sterol regulatory element binding protein-1 |
| t10c12 | CLA C18:2 <i>trans</i>-10, <i>cis</i>-12 |
| TVA | <i>trans</i>-Vaccensäure (C18:1 <i>trans</i>-11), engl.: <i>trans</i>-vaccenic acid |

Gennamen bezeichnen *kursiv* gesetzt die jeweilige mRNA beziehungsweise das Gen selber und *recte* gesetzt das Protein.

Gennamen in eckigen Klammern [] stellen die offiziellen Abkürzungen des HUGO Gene Nomenclature Committee dar (Gray et al., 2013).

1 Einleitung

Allgemein

Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass langkettige Fettsäuren neben ihrer Funktion als Energiereserve auch als Signalmoleküle fungieren und so in eine Vielzahl von weiteren Vorgängen im Körper involviert sind (Glatz und Luiken, 2015). Damit kommen langkettige Fettsäuren als potenzielle Arznei- und Nahrungsergänzungsmittel mit gezielter Wirkung in Betracht. Vor allem bei Fettsäuren, die sich strukturell von den vorherrschenden Fettsäuren eines Organismus unterscheiden oder auch unter bestimmten (Fütterungs-) Bedingungen in verstärktem Maße aufgenommen werden, besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass diese eine spezifische Wirkung entfalten. Eine in dieser Hinsicht vielfach untersuchte Fettsäuregruppe sind die konjugierten Linolsäuren (CLA, engl. conjugated linoleic acids), welche natürlicherweise in Wiederkäuerprodukten wie Milch und Milchprodukten und deren Fleisch zu finden sind. Auswirkungen einer gezielten CLA-Supplementierung wurden unter anderem auch beim Wiederkäuer selbst untersucht. Soosten et al. (2011) und Hötger et al. (2013) konnten beim Wiederkäuer - wie auch in anderen Species einschließlich dem Menschen (Lehnen et al., 2015) - einen Einfluss von CLAs auf den Energiestoffwechsel nachweisen. Baumgard et al. (2001) beobachteten eine Absenkung des MilCHFettgehaltes durch CLA C18:2 *trans*-10, *cis*-12 (t10c12), welcher möglicherweise im Zusammenhang mit einer verbesserten Energiebilanz bei den laktierenden Tieren steht. Auch die Reproduktionsleistung der Milchkühe konnte unter CLA-Supplementierung (Bernal-Santos et al., 2003; Veth et al., 2009) verbessert werden, sodass entsprechende Präparate in der Milchwirtschaft Einsatz finden. Inwiefern sich neben diesen, den Gesamtstoffwechsel betreffenden Einflüssen, auch lokale Einflüsse auf den Gastrointestinaltrakt ergeben, wurde bislang nicht untersucht. Zwar kommt der Gastrointestinaltrakt des Wiederkäuers bei reiner Weidehaltung auf Grund der natürlicherweise ablaufenden fermentativen Umwandlung der Nahrungsfette, bei welcher auch CLAs entstehen, stets mit diesen in Kontakt, jedoch nur in sehr geringen Konzentrationen (Jenkins et al., 2008). Bei einer gezielten Supplementierung hingegen steigt die Exposition des Tieres gegenüber den CLAs stark an. Obwohl ein großer Teil der CLAs in pansengeschützter Form verfüttert wird, ist bekannt, dass der Pansenschutz nicht immer vollständig ist (Jenkins und Bridges, 2007; Pappritz et al., 2011) und somit ein signifikanter Anteil der supplementierten CLAs schon im Pansen freigesetzt wird. Somit stellt das Pansenepithel das erste funktionell wichtige Gewebe dar, welches direkt mit einer großen Menge an CLAs in Berührung kommt.

1.1 CLA-Nomenklatur

Bei konjugierten Linolsäuren oder CLAs handelt es sich um eine Vielzahl von Isomeren, die sich von der Linolsäure (LA, engl. linoleic acid, C18:1 *cis*-9, *cis*-12) ableiten. Im Gegensatz zur LA liegen die beiden Doppelbindungen bei den CLAs direkt hintereinander, sodass diese in Konjugation zueinander stehen (Ha et al., 1987). Je nach Lage der Doppelbindungen (C6-C15) sind bisher 28 verschiedene *cis-cis*, *cis-trans*, *trans-cis* und *trans-trans* konjugierte Fettsäuren identifiziert worden (Eder und Ringseis, 2010). Die Abbildung 1 zeigt die CLA-Isomere C18:2 *cis*-9, *trans*-11 (c9t11) und CLA C18:2 *trans*-10, *cis*-12 (t10c12) im Vergleich zur LA sowie zu den strukturverwandten Fettsäuren, die im Rahmen dieser Dissertation für die Versuche verwendet worden sind.

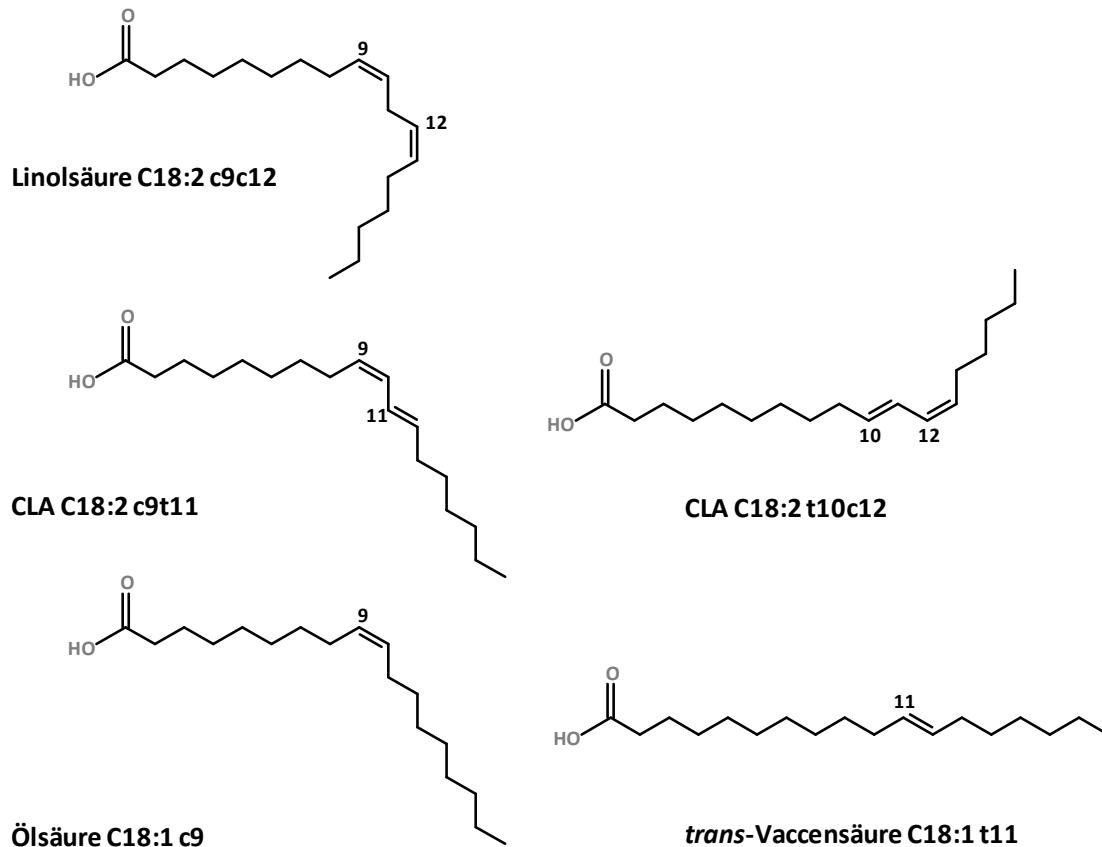


Abbildung 1. Strukturformeln der in den Versuchen verwendeten Fettsäuren

1.2 Bildung von CLAs und deren Vorkommen

In Eukaryonten synthetisierte ungesättigte Fettsäuren liegen auf Grund der Stereospezifität der Desaturasen fast ausschließlich in der *cis*-Konfiguration vor (Sperling et al., 2003; Buist, 2004; Shanklin et al., 2009). Bakterien hingegen bilden auch in größerem Maße *trans*-Fettsäuren (Keweloh und Heipieper, 1996; Cronan, 2002). Im Gewebe von Eukaryonten kommen *trans*-Fettsäuren wie die CLAs somit nur dann vor, wenn sie über die Nahrung aufgenommen oder durch Bakterien im Gastrointestinaltrakt aus Nahrungsbestandteilen gebildet werden. Der Pansen des Wiederkäuers, welcher in Form des größten Vormagens unter anderem für den Aufschluss der pflanzlichen Zellulose und der pflanzlichen Fette mit Hilfe von Mikroorganismen verantwortlich ist, bietet durch die mikrobielle Flora ein großes Potential für die Synthese von *trans*-Fettsäuren, speziell CLAs. Da der Pansen die erste fermentative Verdauungseinheit des Gastrointestinaltraktes des Wiederkäuers darstellt, können die von den Bakterien im Pansen gebildeten *trans*-Fettsäuren in den tieferen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes, insbesondere im Dünndarm, resorbiert werden.

Die Abbildung 2 zeigt die Aufspaltung der Nahrungsfette im Pansen des Wiederkäuers. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA, engl. polyunsaturated fatty acid) werden von Bakterien, Protozoen und zu einem kleinen Teil auch von Pilzen zu gesättigten Fettsäuren (SFA, engl. saturated fatty acid) reduziert (Lourenço et al., 2010). Dieser Prozess wird als Biohydrogenierung bezeichnet und geht häufig mit Isomerisierungen der Fettsäureintermediate einher. Die dabei entstehenden Fettsäuren stellen eine Gruppe von strukturell sehr heterogener Zusammensetzung dar. Die Zusammensetzung ist dabei abhängig von den vorhandenen Mikroorganismen und deren Enzymausstattung. Im Jahre 1966 wiesen Kepler et al. erstmals die Bildung von CLA c9t11 durch *Butyrivibrio fibrisolvens* im Pansen nach. Neben CLA c9t11, welche physiologisch im Pansen (wie auch in der Milch) die vorherrschende konjugierte Fettsäure ist, kommt der CLA t10c12 aufgrund ihrer milchfettreduzierenden Wirkung (Baumgard et al., 2001) eine besondere Bedeutung zu. CLA C18:2 t10c12 wird im Pansen durch *Megasphaera elsdenii* gebildet (Kim et al., 2002). In geringerem Maße werden auch weitere Isomere gebildet (Wallace et al., 2007). Die Abbildung 2 macht auch deutlich, dass konjugierte Fettsäuren als Zwischenprodukte der Biohydrogenierung gesehen werden müssen, sodass die Resorption von CLAs im Dünndarm von der Menge abhängt, die dem Prozess der Biohydrogenierung entgehen kann. Die im Pansen hauptsächlich entstehende Form ist die CLA c9t11 - auch als „ruminic acid“ bezeichnet (Kramer et al., 1998). Durch die rasche, den Futterumständen angepasste Biohydrogenierung zum Beispiel der CLA c9t11 über die *trans*-Vaccensäure (TVA, engl. *trans*-vaccenic acid, C18:1 *trans*-11) bis hin zur Stearinsäure (C18:0) beläuft sich der CLA-Gehalt auf einen Anteil von weniger als 0,5% bezogen auf den Gesamtgehalt an Fettsäuren im Panseninhalt (Chilliard et al., 2007).

Einleitung

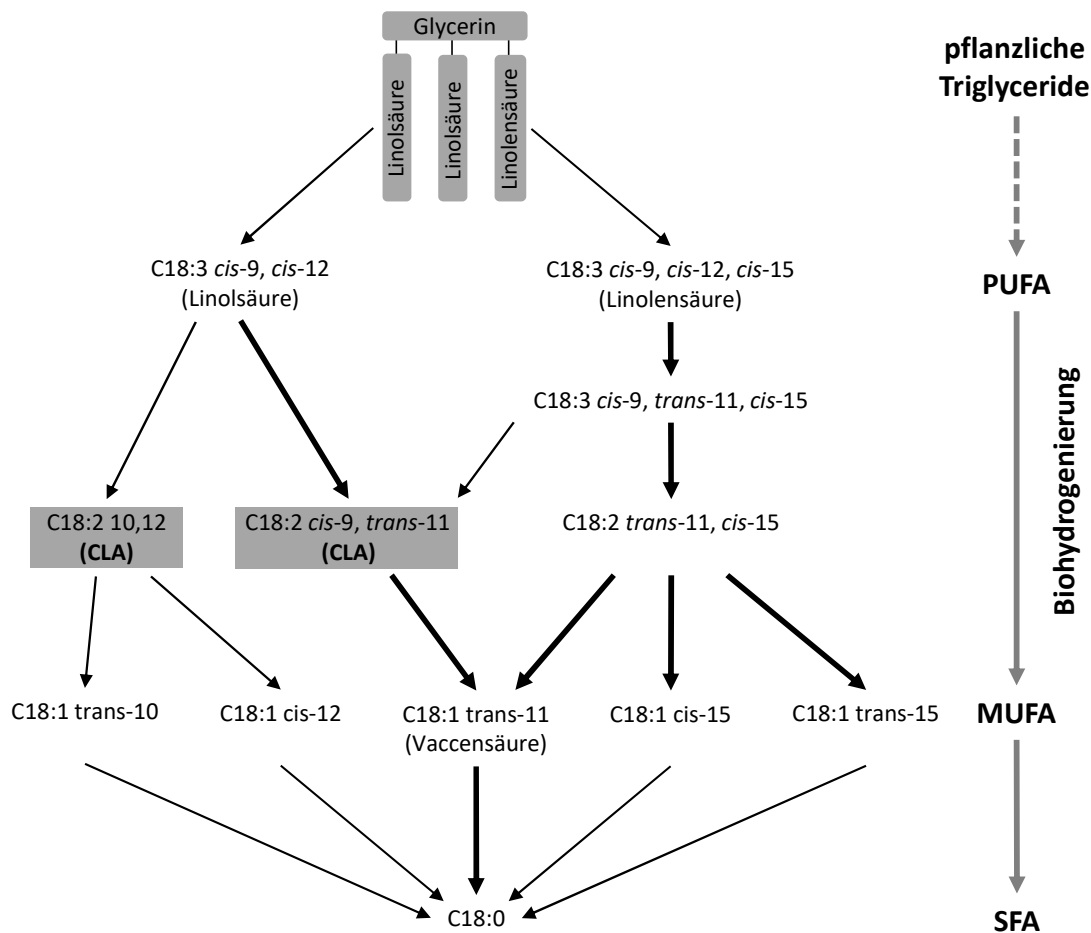


Abbildung 2. Aufspaltung der Nahrungsfette mit anschließender Biohydrogenierung im Pansen der Wiederkäuer (modifiziert nach Lourenço et al., 2010). In der Abbildung sind nicht alle möglichen Zwischenschritte und Isomere genannt, fettgedruckte Pfeile geben die Haupt-Abbauwege wieder.

Die TVA - ebenfalls ein Intermediat der Biohydrogenierung und im Dünndarm resorbierbar - ist Edukt für die endogene CLA c9t11-Produktion mittels Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD, engl. stearoyl-CoA desaturase; siehe Abbildung 3 und Kapitel 1.5.3.2). Diese endogene Produktion ist auch ein Grund dafür, dass Milch und Milchprodukte von Wiederkäuern im Vergleich zu Nicht-Wiederkäuerprodukten (Geflügel-, Schweine-, Fischfleisch) und pflanzlichen Ölen (Fritsche und Steinhart, 1998) höhere CLA-Gehalte aufweisen.

Das nach Steinhart et al. (2003) mit bis zu 84% (bezogen auf den Gesamt-CLA-Gehalt) hauptsächlich vorkommende Isomer in Wiederkäuerprodukten ist die CLA c9t11. Freiverkäufliche Nahrungsergänzungsmittel und zu Forschungszwecken eingesetzte CLA-Mischungen enthalten dagegen auch CLA t10c12 in größeren Mengen. Dies ist in erster Linie

Einleitung

eine Folge der Herstellungsweise von CLAs durch alkalische Isomerisierung oder katalytische Hydrierung, bei der aus LA hauptsächlich CLA c9t11 und t10c12 entstehen (Ma et al., 1999).

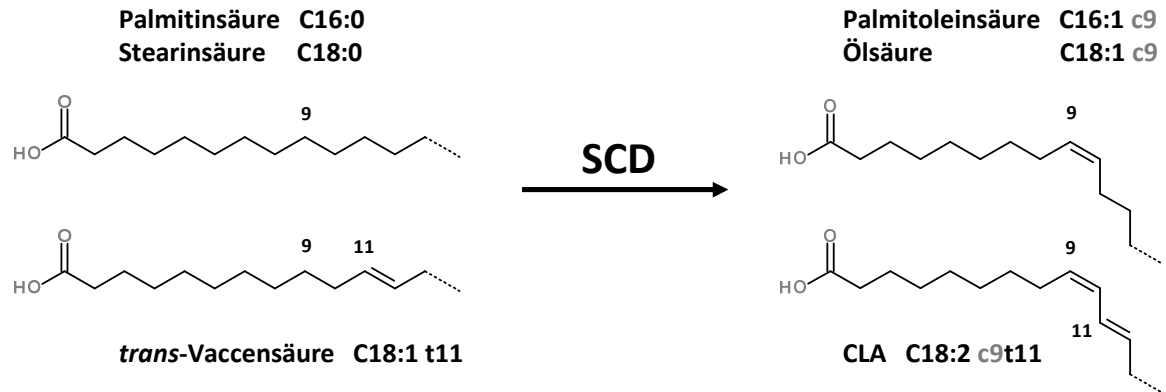


Abbildung 3. Reaktionsschema der SCD

1.3 CLA-Supplementierung beim Rind

Verschiedene Firmen bieten CLA-Produkte für die Supplementierung von laktierenden Kühen an (z.B. Lutrell-Combi®, BASF, Ludwigshafen, Germany; Vilomin® CLA 125, Deutsche Vilomix Tierernährung GmbH, Neuenkirchen-Vörden, Germany; Lodestar™ CLAME-P20, Berg + Schmidt GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany). Durch die Supplementierung von CLAs insbesondere der CLA t10c12 soll eine Absenkung des MilCHFettgehaltes bei konstantem Eiweiß- und Laktosegehalt (Loor und Herbein, 1998; Baumgard et al., 2001) erzielt werden. Des Weiteren scheint sich die CLA-Zulage positiv auf die Energiebilanz (Odens et al., 2007) und auf die Reproduktionsfähigkeit (Veth et al., 2009) der Kühe auszuwirken. Eine neuere Studie zur CLA-Supplementierung zeigt, dass sich vor allem eine präpartum angesetzte Supplementierung positiv auf die erwähnten Eigenschaften auswirkt (Galamb et al., 2016). Bei der Supplementierung werden CLAs in der Regel pansengeschützt verfüttert, um möglichst große Mengen an CLAs bis zum Hauptresorptionsort, dem Jejunum, zu bringen. Eine verbreitete Methode pansengeschützte Fettsäuren zu erhalten, ist die Verseifung mit Calciumhydroxid (Moon et al., 2008). Das entstehende Calciumsalz der Fettsäuren ist weitestgehend unlöslich im wässrigen Milieu und damit für Mikroorganismen nicht ohne weiteres zugänglich. Weitere Möglichkeiten, die Fette zu schützen, sind die Bildung von Amiden, die Behandlung mit Formaldehyd sowie die Einbettung in neutrale Lipide (Moon et al., 2008).

Die Methoden zur Synthese von pansengeschützten Fettsäuren führen aber nur zu einer teilweisen Protektion der Fettsäuren vor dem ruminalen Ab- oder Umbau. Im Jahre 2011

Einleitung

ermittelten Pappritz et al. direkt die Verfügbarkeit von in Lipiden eingebetteten CLAs im Dünndarmchymus. Die Autoren stellten eine sehr geringe Verfügbarkeit im Dünndarm und im Umkehrschluss eine hohe Biohydrogenierungsrate und damit geringe Protektion im Vormagensystem fest. Dies zeigte sich auch in anderen Versuchen, bei denen der CLA t10c12-Transfer in die Milch zur Abschätzung der Protektionsrate herangezogen wurde (Calcium- und Formaldehyd-geschützte CLAs bei Veth et al. 2005 und Amid- und Formaldehydgeschützte CLAs bei Perfield et al. 2004). Dass trotz der Biohydrogenierung, also trotz des Abbaus der CLAs durch die Mikroorganismen, auch bei geringen Protektionsraten von Effekten auf das Pansenepithel ausgegangen werden kann, zeigen *in vitro*-Versuche mit Pansensaft-Kulturen. Troegeler-Meynadier und Mitarbeiter (2006) konnten feststellen, dass die Umsetzung von LA über die CLA c9t11 und die TVA bis zu 24 h andauern kann, sodass bei einer einmaligen erhöhten Aufnahme bzw. Freisetzung dieser Fettsäuren von längeren Verweilzeiten im Pansen ausgegangen werden muss, welche Interaktionen mit dem Pansenepithel über einen längeren Zeitraum zulassen.

1.4 Zu CLAs strukturverwandte Fettsäuren im Pansen

Um die regulativen Einflüsse von verschiedenen langkettigen Fettsäuren (LCFA, engl. long-chain fatty acid) umfassend zu beschreiben, muss man sich darüber im Klaren sein, dass Fettsäuren zwar eine gemeinsame Grundstruktur haben, sich aber in der Kettenlänge, dem Sättigungsgrad, der Lage der Doppelbindungen und der Stereoisomerie unterscheiden (Duplus et al., 2000) und dass diese Unterschiede ursächlich für differierende Effekte der einzelnen Fettsäuren sein können. Die Abbildung 1 zeigt die Fettsäuren, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, um die Wirkung der CLAs von strukturähnlichen Fettsäuren wie der LA und der Ölsäure (OA, engl. oleic acid, C18:1 *cis*-9) abzugrenzen. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die TVA untersucht, die - wie in der Abbildung 3 dargestellt - aufgrund der endogenen CLA-Synthese eine besondere Rolle einnimmt.

Sowohl LA als auch OA kommen im Futter von Wiederkäuern vor. LA ist dabei neben der Linolensäure eine der hauptsächlich vorkommenden Fettsäuren der pflanzlichen Lipide (Glasser et al., 2013). OA hingegen ist neben der LA die Hauptfettsäure in den Triglyceriden von Saatölen, die Bestandteil einiger Futterkonzentraten sind (Bauman et al., 1999). Die TVA entsteht - wie die CLAs - im Rahmen der Biohydrogenierung im Pansen hauptsächlich aus LA und Linolensäure (Abbildung 2). Die Bildung aus OA ist aber ebenfalls möglich (Mosley et al., 2002).

1.5 Potenzielle Wirkungen von CLAs und strukturverwandten Fettsäuren auf das Pansenepithel

1.5.1 Aufbau und Bedeutung des Pansenepithels

Das Pansenepithel übernimmt als mehrschichtig verhorntes Plattenepithel eine Schutz- und Barrierefunktion gegenüber dem Panseninhalt (Graham und Simmons, 2005). Seine Zellschichten gliedern sich funktionell und strukturell in vier Schichten: *Stratum corneum*, *Stratum granulosum*, *Stratum spinosum* und *Stratum basale*. Der Nachweis von zellverbindenden Komponenten wie Tight- und Gap-Junctions zwischen den Pansenepithelzellen (PEZ) lässt die Betrachtung des Pansenepithels als funktionelles Synzytium mit jeweils einer dem Lumen zugewandten und einer blutorientierten Membran zu (Stumpff et al., 2011). Über das Epithel erfolgt der gerichtete Transport von Mikro- und Makronährstoffen aus dem Panseninhalt in das Blut. So werden ein großer Teil der im Pansen entstehenden kurzkettigen Fettsäuren (SCFA, engl. short-chain fatty acid) direkt resorbiert (Gäbel et al., 2002). Sie dienen dem Wiederkäuer als Hauptenergiequelle (Bergman et al., 1965; Siciliano-Jones und Murphy, 1989). Sowohl die luminale Aufnahme in die Epithelzellen als auch die basolaterale Ausschleusung der SCFAs aus den Epithelzellen kann einerseits passiv (undissoziierte, lipophile SCFAs) und andererseits mit Hilfe von Membranproteinen (dissoziierte, hydrophile SCFAs) erfolgen, wobei die lipophile Diffusion eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Aschenbach et al., 2009).

1.5.2 Resorption von langkettigen Fettsäuren über das Pansenepithel

Im Gegensatz zur Resorption von SCFAs sind für LCFAs keine proteingekoppelten Transportmechanismen bekannt. Verfügbare Studien zur Resorption von LCFAs über das Pansenepithel sind in der Arbeit von Jenkins (1993) zusammengefasst. Die Ergebnisse zur Resorption von LCFAs variieren sehr stark, von 0,3% der zugegebenen Menge (Wood et al., 1963) bis hin zu 31,5% (Goosen, 1975). Der Vergleich von Studien in der Arbeit von Jenkins (1993), die den Lipidfluss vom Maul bis zum Dünndarm untersucht hat, zeigt, dass bei den Tieren, die zusätzliches Fett gefüttert bekamen, der Lipidgehalt im Dünndarm häufiger unter dem Ausgangslipidgehalt im Futter lag als bei Tieren aus den Kontrollgruppen. Man könnte also daraus schließen, dass sich bei erhöhter Zufuhr, wie beispielsweise im Rahmen einer Supplementierung, ein „Resorptionsdruck“ im Pansen aufbaut.

1.5.3 Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung der Gewebe nach Supplementierung

Zahlreiche Studien zeigen, dass PUFAs (Barzanti et al., 1994; Abbott et al., 2012) und im Speziellen CLAs (Ostrowska et al., 2003; Oikawa et al., 2005) bei oraler Verabreichung die Fettsäurezusammensetzung in verschiedenen Geweben verändern und in der Folge Auswirkungen auf zellspezifische Enzyme haben. Die Veränderungen in der Fettsäure-

zusammensetzung können sich in unterschiedlicher Form bemerkbar machen. Die relative Konzentration der Fettsäuren untereinander sowie die Kettenlänge, der Sättigungsgrad und der Anteil an verschiedenen Isomeren (z.B. *cis/trans*) können sich verändern.

1.5.3.1 Metabolisierung

Generell umfasst die Metabolisierung von PUFAs und einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA, engl. monounsaturated fatty acid) Prozesse der β -Oxidation, der Elongation und der Desaturierung, unabhängig davon, ob *cis*- oder *trans*-Doppelbindungen vorliegen. CLAs und LA werden unter Beibehaltung ihrer Ausgangs-Di-en-Struktur (konjugiert oder nicht) mit Hilfe der $\Delta 5$ - und $\Delta 6$ -Desaturase zu konjugierten oder nicht-konjugierten C18:3-Fettsäuren reduziert. Des Weiteren können CLAs und LA sowie deren Metaboliten Elongationsprozessen (konjugierte oder nicht-konjugierte C20:2 und C22:2, C20:3, C20:4, C22:4) sowie der β -Oxidation (konjugierte oder nicht-konjugierte C16:2, C16:3) zugeführt werden. Ebenso gilt dies für TVA und OA (Eder und Ringseis, 2010). So konnten Jaudszus et al. (2014) die 16:1 t9 als β -Oxidations-Produkt der TVA nachweisen.

Bei Betrachtung der verschiedenen Studien zu Metaboliten von CLA-Isomeren in Lebergewebe (Sébédio et al., 1997; Banni et al., 2001; Sébédio et al., 2001; Banni et al., 2004a) sowie in Plasma, Nieren- und Fettgewebe von Ratten (Banni et al., 2004a), in humanen Gefäßmuskeln (Müller et al., 2005), in humanen Gefäßendothelzellen (Ringseis et al., 2006), weißen Blutzellen (Agatha et al., 2004) und Hepatozyten (Park et al., 2005) fällt auf, dass nicht immer alle theoretisch möglichen Metaboliten detektiert wurden. Hierfür sind mindestens zwei Gründe denkbar: (a) unterschiedliches Verteilungsverhalten der verschiedenen Fettsäuren und ihrer Metaboliten in die verschiedenen Lipidklassen oder (b) Konkurrenzverhalten beziehungsweise Interaktionen zwischen den Fettsäuren. Hinsichtlich des Verteilungsverhaltens konnte gezeigt werden, dass CLAs hauptsächlich in Neutralfette (z.B. Triglyceride) eingebaut werden, wohingegen die LA und ihre Metaboliten in Phospholipide eingebaut werden (Banni et al., 2001). Die Tatsache, dass in den verschiedenen Studien unterschiedliche Extraktionsmethoden verwendet werden, die unter Umständen nicht immer alle Lipidklassen gleichermaßen erfassen, kann eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Hinsichtlich der Interaktion zwischen den Fettsäuren können beispielhaft Studien genannt werden (Sébédio et al., 1997; Sébédio et al., 1999; Sébédio et al., 2001; Banni et al., 2004b), in denen bei Abwesenheit von LA eine CLA-Behandlung die Bildung von konjugierter C20:4 verstärkte, wohingegen bei Vorhandensein von LA dieser Metabolit nicht nachgewiesen werden konnte. Folglich kann sowohl die vorhandene Matrix an Fettsäuren als auch die Fettsäurezufuhr über das Futter bzw. Nährmedium die Metabolisierung von CLA-Supplementen modulieren.

Einleitung

Neben diesen Gründen können auch die von Demizieux et al. (2002) sowie von Eder und Ringseis (2010) beschriebenen Unterschiede in der Oxidationsrate von CLAs/CLA-Metaboliten und LA/LA-Metaboliten zu Variationen in der Detektion von weiteren Metaboliten führen. Konjugierte Fettsäuren werden langsamer oxidiert als die entsprechenden nicht-konjugierten Fettsäuren und akkumulieren daher unter anderem in den Mitochondrien. Dabei scheinen sie auch die Oxidationsraten anderer Fettsäuren, z.B. die der LA oder der Palmitinsäure (C16:0), negativ zu beeinflussen (Demizieux et al., 2002).

Unabhängig davon, welche Metaboliten entstehen beziehungsweise nachgewiesen werden können, zeigt der Nachweis von Metaboliten die Verstoffwechselung der supplementierten Fettsäuren und damit die aktive Beteiligung am Fettsäuremetabolismus. Zudem üben vielfach nicht nur die Ausgangsubstanzen, in diesem Falle die supplementierten Fettsäuren, Einflüsse auf die vorhandenen Strukturen aus, sondern auch deren Metaboliten.

1.5.3.2 SCD und die endogene Synthese von CLA C9t11

Die SCD (auch SCD1) gehört zur Familie der Fettsäuredesaturasen mit der Funktion, den Anteil ungesättigter Fettsäuren in einem Gewebe beziehungsweise im gesamten Organismus zu erhöhen. Dabei erfolgt die Reduktion der Fettsäuren positions- und stereospezifisch am neunten C-Atom in *cis*-Konfiguration. Die Hauptsubstrate der SCD sind die SFAs Palmitinsäure (C16:0) und Stearinsäure (C18:0), aus welchen die MUFAs Palmitoleinsäure (C16:1 *cis*-9) und OA (C18:1 *cis*-9) gebildet werden (Ntambi und Miyazaki, 2003).

Neben diesen Hauptsubstraten kann das Enzym aber auch weitere Fettsäuren desaturieren, so auch exogen aufgenommene oder endogen gebildete *trans*-Fettsäuren wie die TVA (Pollard et al., 1980). Beim Rind ist die Umwandlung der TVA in die CLA C9t11 im Milchdrüsengewebe laktierender Kühe intensiv untersucht. Es konnte in Versuchen an laktierenden Kühen gezeigt werden (Griinari et al., 2000), dass eine abomasale TVA-Infusion zu einer erhöhten Konzentration an CLA C9t11 im Milchfett führte, was auf eine entsprechende Aktivität der SCD in den dem Abomasum nachgeschalteten Geweben hinweist. Einen direkten Nachweis der Umwandlung mit der Gabe von ¹³C-markierter TVA und anschließender Messung der ¹³C-Anreicherung der Milch-CLA C9t11 führten Mosley et al. (2006). Beim Rind ist bisher neben der SCD nur eine weitere Isoform, die SCD5 bekannt, welche hauptsächlich im Gehirn vorzukommen scheint (Lengi und Corl, 2007). Die Tabelle 1 fasst zusammen, in welchen Geweben von Wiederkäuern bisher die SCD (SCD1) auf Gen- oder Proteinebene nachgewiesen wurde. Der Nachweis der SCD im Pansenepithel wurde bis dato nicht ausreichend erbracht. Bei einem positiven Nachweis der endogenen Synthese von CLA C9t11 aus supplementierter TVA im Gesamtfett des Pansenepithels ist eine Beeinflussung des Stoffwechsels der Zellen durch CLAs denkbar. Des Weiteren sind Auswirkungen auf die

Einleitung

Palmitoleinsäure (C16:1 *cis*-9) und OA (C18:1 *cis*-9) nach CLA-Behandlung sehr wahrscheinlich (Lee et al., 1998; Choi et al., 2001).

Tabelle 1. Protein- und mRNA-Nachweis der SCD in verschiedenen Geweben von Wiederkäuern

| Literatur | Milchdrüse (laktierend) | Leber | Fettgewebe (intestinal) | Fettgewebe (subkutan) | Gehirn | Herz | Skelettmuskel | Pancreas | Niere | Milz | Lunge | Pansen | Dünndarm | Dickdarm | Methode |
|-----------------------------------|-------------------------|-------|-------------------------|-----------------------|----------------|------|---------------|----------|-------|------|-------|--------|----------|----------|------------------------|
| Rind | | | | | | | | | | | | | | | |
| Kinsella, 1972 | x | | | | | | | | | | | | | | SCD conversion assay |
| St John et al., 1991 | | --- | | x | | | | | | | | | | | SCD conversion assay |
| Martin et al., 1999 | | | | ■ | | | | | | | | | | | Northern Dot Blot |
| Lengi und Corl, 2007 ¹ | | ■ | ■ ² | | ■ ³ | ■ | ■ | | | (■) | ■ | | | | RTq-PCR |
| Rezamand et al., 2014 | ■ | (■) | ■ | | | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | ■ | RTq-PCR |
| | □ | (□) | □ | | | □ | □ | | | | □ | (□) | (□) | (□) | Westernblot |
| Schaf | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ward et al., 1998 | ■ | ■ | | ■ ⁴ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | RNase protection assay |
| Dervishi et al., 2011 | | | | | | | ■ | | | | | | | | RTq-PCR |
| Ziege | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bernard et al., 2001 | ■ | | | | | | | | | | | | | | Northernblot |
| Ebrahimi et al., 2013 | | | | ■ | | | | | | | | | | | RTq-PCR |
| Ebrahimi et al., 2014 | | | | | | | ■ | | | | | | | | RTq-PCR |

x = Nachweis der Umwandlung von TVA in CLA c9t11, --- = Umwandlung von TVA in CLA c9t11 wurde nicht nachgewiesen, ■ = mRNA-Nachweis, □ = Protein-Nachweis, () = nicht eindeutiger Nachweis

¹ Keine Differenzierung bezüglich des Fettgewebetyps

² für weitere Differenzierung bezüglich verschiedene Fettgewebetypen (Ji et al., 2014)

³ für weitere Differenzierung bezüglich verschiedene Gehirnregionen (Lengi und Corl, 2015)

⁴ für weitere Differenzierung bezüglich verschiedene Fettgewebetypen (Barber et al., 2000; Yue et al., 2016)

1.5.4 CLA-Targets im Pansenepithel

1.5.4.1 SCD

Die vielfältigen biochemischen und physiologischen Funktionen der SCD und ihrer Produkte (Palmitoleinsäure, C16:1 *cis*-9 und OA, C18:1 *cis*-9; Paton und Ntambi, 2009; Sampath und Ntambi, 2014) machen deutlich, wie wichtig eine angepasste Regulation der SCD für den Organismus ist.

Die Regulation der SCD ist sowohl auf Genebene als auch posttranslational möglich (mRNA-Abbau: Sessler et al., 1996; Gonzalez und Martin, 1996 und Proteinabbau: Heinemann und Ozols, 1998; Mziaut et al., 2000) sowie durch Modulation der Enzymaktivität. Die meisten Erkenntnisse über die Genregulation der *SCD* stammen bisher aus Untersuchungen von Nagern, wo die SCD hauptsächlich in der Leber und im Fettgewebe vorkommt (Ntambi, 1995). Als Regulatoren der Genexpression sind verschiedene Hormone und Nahrungsbestandteile, unter anderem PUFAs, bekannt (Mauvoisin und Mounier, 2011). PUFAs wirken als Inhibitoren der *SCD*-Genexpression (Ntambi, 1999; Mauvoisin und Mounier, 2011). Im Allgemeinen interagieren sie mit einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren. In Bezug auf die *SCD* sind hier peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP)/max-like protein X (MLX), nuclear transcription factor Y (NF-Y), liver X receptor (LXR) und retinoid X receptor (RXR) zu nennen, wobei sich Hinweise mehren, dass nicht ein Transkriptionsfaktor allein die Regulation der *SCD* übernimmt, sondern vielmehr durch das Zusammenspiel mehrerer Faktoren eine Feinjustierung möglich ist (Jump et al., 2006; Mauvoisin und Mounier, 2011). Die Arbeiten von Keating et al. (2006) und Zulkifli et al. (2010) geben Auskunft über die Promotorstruktur des *SCD*-Genes beim Wiederkäuer. Ein PPAR-response element (PPRE) wurde beim Wiederkäuer noch nicht eindeutig identifiziert.

Auf Grund von Studien mit PPAR-Agonisten (vor allem PPAR α -Agonisten) und der Untersuchung des Promotors in verschiedenen anderen Spezies (Montanaro et al., 2007) ist ein Einfluss von durch PUFAs, respektive CLAs, aktivierten PPARs auf die *SCD* sehr wahrscheinlich. Welche Rolle die Dosierung der Fettsäuren, die untersuchte Spezies bzw. der untersuchte Zelltyp oder auch der Fettsäurestatus spielen, ist nicht abschließend geklärt, was die zum Teil kontroversen Ergebnisse in Bezug auf Promotoraktivitäten und mRNA-Veränderungen in vorangegangenen Studien zu erklären vermag (Tabelle 2).

Ein Parameter, um die Aktivität der SCD und damit mögliche regulative Einflüsse einzugrenzen, ist der sogenannte Desaturase-Index (SCDI-16, SCDI-18 oder Index nach Corl et al., 2001). Dieser berechnet sich aus dem Verhältnis von Produkt zu Edukt einer enzymatisch kontrollierten Reaktion. Im Falle einer positiven Korrelation von mRNA-Veränderungen und Veränderungen im Desaturase-Index ist man geneigt, Ursache und

Auswirkung in direkten Zusammenhang zu stellen. Bisherige Untersuchungen zu Wirkungen von PUFAs und CLAs auf die Expression von Desaturase-mRNA, die Desaturase-Aktivität und die Desaturase-Indizes sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

1.5.4.2 Monocarboxylattransporter

Die Aufnahme von im Pansen gebildeten SCFAs (v.a. Azetat, Propionat und Butyrat) über das Pansenepithel ist von enormer Bedeutung für den Wiederkäuer: Zum einen dient die Absorption der SCFAs der direkten Energiebereitstellung, da Wiederkäuer einen Großteil ihres Energiebedarfs über die im Pansen aus der Nahrung gebildeten SCFAs abdecken (Bergman, 1990). Zum anderen erfolgt durch die Absorption der Säureäquivalente eine Stabilisierung des intraruminalen Milieus, welches stark vom pH-Wert abhängig ist (Gäbel et al., 2002; Aschenbach et al., 2011). Die Absorption umfasst dabei die apikale Aufnahme der SCFAs in die Epithelzellen sowie in die basolaterale Abgabe vom Cytosol in Richtung Blut. Neben der passiven Diffusion der protonierten Form der SCFAs über die apikale Zellmembran erfolgt der Großteil der Diffusion proteinvermittelt mit Hilfe von Transportern (Aschenbach et al., 2009). Diese müssen basolateral auch die intrazellulär gebildeten Metaboliten der SCFAs, namentlich β -Hydroxybutyrat, Azetoazetat und Laktat ausschleusen.

Die Monocarboxylattransporter (MCT), die zur Familie 16 der Solute-Carrier-Proteine (SLC16) gehören, können als Monocarbonsäure-Transporter die genannten Substrate binden und über die Zellmembran transportieren (Halestrap, 2012). Die Isoform 1 des MCT ist im Pansenepithel basolateral lokalisiert (Schaf: Müller et al., 2002; Ziege: Kirat et al., 2006; Rind: Graham et al., 2007; Kalb: Pfannkuche et al., 2013; Gen: SLC16A1) und vermittelt vermutlich den Transport von SCFAs und deren Metaboliten aus dem Cytosol in Richtung Blut. Hierbei können die SCFAs protonengekoppelt transportiert werden (Halestrap, 2012). Die Arbeit von Dengler et al. (2013) weist zudem auf eine mögliche HCO_3^- -Abhängigkeit des MCT1 im Pansen hin. Gleiches wird auch von Ritzhaupt et al. (1998) für den MCT1 bei luminalen Membranvesikeln des Schweinecolons beschrieben. Die MCT4-Isoform (Gen: SLC16A4) wird eher der apikalen Epithelzellmembran im Pansen zugeordnet (Kirat et al., 2007), ebenfalls in Zusammenhang mit einem Protonen-gekoppelten Transport. Die Arbeit von Pfannkuche et al. (2013) zeigt, dass MCTs für die Anpassung des Pansens an veränderte Futterumstände, wie dies unter anderem beim heranwachsenden Kalb der Fall ist, von großer Bedeutung sind. Die Regulierung der MCTs kann dabei sowohl auf Transkriptions-, Translations- und Posttranskriptionsebene erfolgen (Halestrap, 2013).

Ausgehend von König et al. (2008) konnten Benesch et al. (2014) mit Hilfe von WY 14.643, einem selektiven PPAR α -Agonisten (Kliwer et al., 1994), an primärkultivierten PEZ zeigen, dass auch im Pansen eine Regulation des *MCT1* auf Genebene über PPAR α erfolgt.

Einleitung

Tabelle 2. Übersicht von PUFA- und CLA-Effekten auf die SCD

| Zellkultur/Gewebe | Fettsäurebehandlung | Promotor-aktivität | mRNA-Expression | Protein-gehalt | SCD-Aktivität | SCDI-16 | SCDI-18 | Literatur |
|-------------------------|--|--------------------|--------------------|-----------------|---------------|---------|---------|-------------------|
| Lebergewebe (ICR-Mäuse) | 0,5 % CLA-Gemisch [#] (42% c9t11 und 44% t10c12) | -- | ↓ s ¹ | -- ² | -- | ↓ | ↓ | Lee et al., 1998 |
| H2.35-Zellen | 150 µM CLA-Gemisch (42% c9t11 und 44% t10c12) | -- | ↓ s | -- | -- | ↓ | ↓ | |
| | ? µM c9t11 | -- | ↔ s | -- | -- | ↔ | ↔ | |
| | 150 µM Arachidonsäure | | ↓ s | -- | -- | ↓ | ↓ | |
| 3T3-L1 Adipozyten | 25 - 100 µM CLA-Gemisch (46% c9t11 und 48% t10c12) | -- | ↓ s | ↓ | -- | ↓ | ↓ | Choi et al., 2000 |
| | 45 µM c9t11 | -- | (↓) ³ s | ↔ | ↔ | -- | -- | |
| | 45 µM t10c12 | -- | ↓ s | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| HepG2-Zellen | 100 µM CLA-Gemisch (46% c9t11 und 48% t10c12) | -- | ↔ s | ↔ | -- | ↓ | ↓ | Choi et al., 2001 |
| | 45 µM c9t11 | ↔ | ↔ s | ↔ | ↔ | ↔ | ↔ | |
| | 45 µM t10c12 | ↔ | ↔ s | ↔ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| | 100 µM Linolsäure | ↓ | ↓ s | ↓ | -- | -- | -- | |
| MDA-MB-231-Zellen | 100 µM CLA-Gemisch (46% c9t11 und 48% t10c12) | -- | ↔ s | ↓ | -- | ↓ | ↓ | Choi et al., 2002 |
| | 45 µM c9t11 | -- | ↔ s | ↓ | -- | ↓ | ↓ | |
| | 45 µM t10c12 | -- | ↔ s | ↓ | -- | ↓ | ↓ | |
| | 100 µM Linolsäure | -- | ↓ s | ↓ | -- | -- | -- | |
| MCF-7-Zellen | 100 µM CLA-Gemisch (46% c9t11 und 48% t10c12) | -- | ↔ s | ↔ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| | 45 µM c9t11 | -- | ↔ s | ↔ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| | 45 µM t10c12 | -- | ↔ s | ↔ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| | 100 µM Linolsäure | -- | ↓ s | ↓ | -- | -- | -- | |

Einleitung

| | | | | | | | |
|--|---|----|-----|----|-----|--------------------------------|----------------------------|
| Subkutanes Fettgewebe vom Schwein | 1,5 % CLA-Gemisch [#] (7% c9t11 und 6,5% t10c12) | -- | -- | -- | (↓) | ↓ Index nach Corl et al., 2001 | Smith et al., 2002 |
| Lebergewebe von Mäuse (post partum) | 1% c9t11 [#] | -- | ↔ s | -- | ↓ | -- | Lin et al., 2004 |
| | 1% t10c12 [#] | -- | ↔ s | -- | ↓ | -- | |
| | 1% TVA [#] | -- | ↔ s | -- | ↔ | -- | |
| Milchdrüsengewebe von Mäusen (post partum) | 1% c9t11 [#] | -- | ↓ s | -- | ↓ | -- | |
| | 1% t10c12 [#] | -- | ↓ s | -- | ↓ | -- | |
| | 1% TVA [#] | -- | ↓ s | -- | ↓ | -- | |
| Lebergewebe von Ratten | 1,5% CLA-Gemisch [#] (39.2% c9t11 und 38.5% t10c12) | -- | ↓ | -- | -- | ↓ | Purushotham et al., 2007 |
| HEK 293-Zellen u. McA-RH7777-Zellen | 60 µM Ölsäure | ↓ | ↓ | -- | -- | -- | Zulkifli et al., 2010 |
| | 60 µM Linolsäure | ↓ | ↓ | -- | -- | -- | |
| Humane Primäradipozyten | 30 µM c9t11 oder 30 µM t10c12 | -- | -- | -- | -- | ↓ | Obsen et al., 2012 |
| SGBS-Zellen | 30 µM c9t11 | -- | -- | ↔ | -- | -- | |
| | 30 µM t10c12 | -- | ↓ | ↓ | -- | -- | |
| HAMSC-Zellen | 100 µM Ölsäure | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↔ | Minville-Walz et al., 2012 |
| | 100 µM TVA | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↑ | |

[#]Fütterungsversuch ¹s = semiquantitativ ²-- = nicht analysiert ³() = tendenzieller Effekt n.b. = nicht bestimmbar

PPAR γ scheint bei der Regulierung von *MCT1* auf Genebene eher keine Rolle zu spielen (König et al., 2008). Die Regulierung von *MCT4* konnte noch nicht abschließend geklärt werden (Benesch et al., 2014). Die Beeinflussbarkeit der MCTs durch CLAs konnten König et al. (2010) zeigen, indem sie die Auswirkungen von natürlichen PPAR α -Liganden wie CLAs auf den *MCT1* in Lebern von Ratten und Schweinen untersuchten.

1.5.4.3 PPAR als Transkriptionsfaktor für die *SCD* und die *MCTs*

PPARs sind liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren gehören. Die gewebspezifische Expression der PPAR-Isoformen (PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ) und die jeweilige Möglichkeit, den PPAR-Effekt auf unterschiedlichen Ebenen zu regulieren, begründet die Beteiligung der PPAR an einer Vielzahl von Stoffwechselvorgängen (Schoonjans et al., 1996; Michalik et al., 2006). Neben der Aktivierung durch unterschiedlichste endogene und exogene Liganden kann eine Regulation sowohl auf Ebene der Genexpression (Moya-Camarena et al., 1999b; Kang et al., 2003) als auch auf Proteinebene (Phosphorylierungsstatus: Burns und Vanden Heuvel, 2007) stattfinden.

Die Aktivierung durch endogene und exogene Liganden führt zur Heterodimerisierung des PPAR mit dem retinoid X receptor (RXR). Dieser heterodimere Komplex stellt den eigentlichen Transkriptionsfaktor dar, welcher durch Bindung an das PPAR-response element (PPRE) im Promotor des Targetgens eine verstärkte Expression auslöst (Kliwer et al., 1992). Zusätzlich zur direkten Aktivierung durch PPAR-Liganden kann das PPAR/RXR-Dimer auch von RXR-Liganden alleine oder synergistisch aktiviert werden (Kliwer et al., 1992; Keller et al., 1993). Bekannte synthetische PPAR-Liganden, das heißt Agonisten, sind Fibrate (hauptsächlich PPAR α : Issemann et al., 1993 und Forman et al., 1997) und die Thiazolidindione, auch Glitazone genannt (PPAR γ : Lehmann et al., 1995; Willson et al., 1996). Zu den natürlichen Liganden gehören Eicosanoide und PUFAs (Kliwer et al., 1997; Krey et al., 1997). Nachdem Moya-Camarena et al. (1999a;1999b) für PPAR α sowie Houseknecht et al. (1998) und Brown et al. (2003) für PPAR γ die Aktivierung durch CLAs (unter anderem aus der Gruppe der langkettigen ungesättigten Fettsäuren) nachweisen konnten, spezifizierten Benjamin et al. (2005) die PPAR-Transaktivierung in Bezug auf Subtyp und CLA-Vorläuferfettsäuren.

Die Bedeutung des PPAR im Pansenepithel zeigt sich in der Studie von Connor et al. (2013). Sie untersuchten das Pansenepithel bei Kälbern in der Phase des Absetzens. Es zeigte sich, dass PPAR α als Transkriptionsfaktor für die Aktivierung einer Vielzahl von Genen verantwortlich ist, die der β -Oxidation, der Apoptose, der Organentwicklung, des Nährstoffmetabolismus und der Immunantwort zugeordnet werden können. Bünger et al. (2007) untersuchten mittels Ingenuity Pathways Analysis (IPA) die Einflüsse von PPAR α im Dünndarm von adulten Menschen und Mäusen und äußerten erstmals den Verdacht, dass

Einleitung

PPARs neben ihrer zentralen Funktion für den Fettsäuremetabolismus ausgehend von der Leber (Mandard et al., 2004; Lefebvre et al., 2006) auch direkt im Gastrointestinaltrakt wie dem Darm oder dem Pansen einen Einfluss als Fettsäuresensor haben könnten.

Den Nachweis von PPAR α und PPAR γ in den PEZ vom Schaf auf mRNA- und auch auf funktioneller Ebene erbrachten die Untersuchungen von Benesch et al. (2014). Ein indirekter Nachweis von PPAR α im Pansenepithel vom Rind mit einer sogenannten IPA wurde von Connor et al. (2013) geführt. Über die Funktion der PPARs im Pansen adulter Tiere ist allerdings bisher wenig bekannt. Lokale Veränderungen am Pansenepithel könnten auf Grund der zentralen Rolle des Pansens im Energiestoffwechsel der Wiederkäuer großen Einfluss auf den gesamten Metabolismus der Tiere haben.

2 Zielstellung

Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe einer primären Pansenepithelzellkultur vom Schaf mögliche Einflüsse von CLAs und strukturverwandten Fettsäuren auf den Gehalt und die Verteilung von Fettsäuren sowie weitere Effekte auf mRNA-Ebene in Pansenepithelzellen aufzudecken.

Zum einen sollte das Augenmerk auf Veränderungen im Fettsäuremuster liegen, um Angaben über die Aufnahme und Metabolisierung der CLAs und der verwandten Fettsäuren in den kultivierten Pansenepithelzellen machen zu können.

Hinsichtlich der Veränderungen im Fettsäuremuster sollten

1. Gehalt und Zusammensetzung der Fettsäuren in den Zellen unter Einfluss von CLA c9t11 und CLA t10c12 sowie strukturverwandter Fettsäuren wie der Linolsäure, der Ölsäure und der *trans*-Vaccensäure erfasst werden und
2. potenzielle Metaboliten der exogen zugegebenen CLA-Isomere identifiziert werden.

Zum anderen sollten mögliche Effekte der zugegebenen Fettsäuren auf bisher bekannte CLA-Targets in den Pansenepithelzellen eruiert werden. Hierbei fokussierte sich die Zielstellung auf folgenden Punkte:

1. Als ein Target der CLAs sollte die SCD im nativen Pansenepithel generell nachgewiesen werden, um dann den Einfluss von CLAs sowie verwandten Fettsäuren auf die SCD-mRNA-Expression in kultivierten Epithelzellen zu erfassen.
2. Die potenziell veränderte SCD-Aktivität sollten über die Erfassung des Fettsäuremusters untersucht werden.
3. Weiterhin sollte nach Veränderungen in der mRNA-Expression des *MCT1* und des *MCT4* gesucht werden, da diese im Pansenepithel eine wichtige Rolle bei der SCFA-Resorption spielen und in vorherigen Untersuchungen ebenfalls als CLA-Targets beschrieben wurden.
4. PPAR α und PPAR γ sind als mögliche Targets von CLAs bereits identifiziert. Welchen Einfluss diese unter CLA c9t11-Zugabe auf die Regulation der SCD- oder MCT-Transkription haben, ist noch nicht abschließend geklärt und sollte daher untersucht werden. Mit Hilfe spezifischer PPAR α - und PPAR γ -Antagonisten sollten die regulierenden Einflüsse von PPAR auf die SCD und die MCTs weiter eingegrenzt werden.

3 Originalarbeit

Conjugated linoleic acids influence fatty acid metabolism in ovine ruminal epithelial cells

Beeinflussung des Fettsäuremetabolismus von Pansenepithelzellen des Schafes durch konjugierte Linolsäuren

Konjugierte Linolsäuren (CLA), wie die CLA *cis*-9, *trans*-11 (c9t11) und die CLA *trans*-10, *cis*-12 (t10c12), werden im Rahmen der Milchwirtschaft als Futterergänzungsmittel für laktierende Kühe eingesetzt, um den ständig wachsenden Leistungsanforderungen an die Tiere zu begegnen. Bei entsprechender oraler Aufnahme ist der Pansen und insbesondere das Pansenepithel direkt den in großer Menge anflutenden Fettsäuren ausgesetzt, sodass sich die vorliegende Arbeit mit dem Effekt von CLAs auf den Fettsäuremetabolismus der Pansenepithelzellen (PEZ) beschäftigt, sowie mit Genen, von denen bekannt ist, dass sie von Fettsäuren wie den CLAs moduliert werden können.

Für die Untersuchungen wurden primärkultivierte PEZ vom Schaf mit den CLAs c9t11 und t10c12 sowie strukturell ähnlichen Fettsäuren wie der Linolsäure, der Ölsäure und der *trans*-Vaccensäure für 48 h in einer Konzentration von 100 µM inkubiert. Anschließend wurden durch gaschromatische Auftrennung mit anschließender Analyse die Fettsäuregehalte der PEZ sowie die mRNA-Expression von Zielstrukturen, wie der Stearoyl-CoA-Desaturase (*SCD*) und der Monocarboxylat-Transporter (*MCT*) 1 und 4 durch RT-qPCR erfasst.

Bei den Fettsäuregehalten der PEZ zeigten sich signifikante Veränderungen im Gehalt von Fettsäuremetaboliten der β -Oxidation und der Elongation sowie der *SCD* nach Exposition der Zellen gegenüber den CLA-Isomeren, der Linolsäure, der Ölsäure und der *trans*-Vaccensäure. Die Änderungen, die sich im Zusammenhang mit der *SCD*-Aktivität ergaben, deuten darauf hin, dass die Pansenepithelzellen zusätzlich zu den zugeführten CLAs, CLA c9t11 endogen aus der *trans*-Vaccensäure synthetisieren können. Weiterhin führte die Inkubation mit den CLAs sowie der Linolsäure, Ölsäure und der *trans*-Vaccensäure zu einem Absinken der *SCD*-mRNA-Expression. Übereinstimmend fanden wir eine Reduktion der Gehalte von C16:1n-7 *cis*-9 und C18:1n-9 *cis*-9 (Hauptprodukte der *SCD*). Die *MCT1*-mRNA-Expression war durch die Behandlung mit c9t11 und t10c12 erhöht. Ebenso induzierte c9t11 eine erhöhte *MCT4*-mRNA-Expression. Durch Verwendung von peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α -Antagonisten konnte die Beteiligung von PPAR α an den c9t11-induzierten Veränderungen der *MCT1*-, *MCT4*- und *SCD*-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Die Beteiligung von PPAR γ konnte in Bezug auf die *MCT1*- und *SCD*-mRNA-Expressionsänderungen ebenfalls mit dem entsprechenden Antagonisten festgestellt werden.

Originalarbeit

Die Studie zeigt, dass sowohl der Fettsäuremetabolismus als auch Genregulationsmechanismen von exponierten Zellen wie den Pansenepithelzellen durch die Exposition gegenüber CLAs verändert werden.



J. Dairy Sci. 99:3081–3095
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10042>
 © American Dairy Science Association®, 2016.

Conjugated linoleic acids influence fatty acid metabolism in ovine ruminal epithelial cells

F. Masur,^{*1} F. Benesch,^{*} H. Pfannkuche,^{*} H. Fuhrmann,[†] and G. Gäbel^{*}

^{*}Institute of Veterinary Physiology, and

[†]Institute of Physiological Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, 04103, Germany

ABSTRACT

Conjugated linoleic acids (CLA), particularly *cis*-9,*trans*-11 (c9t11) and *trans*-10,*cis*-12 (t10c12), are used as feed additives to adapt to constantly increasing demands on the performance of lactating cows. Under these feeding conditions, the rumen wall, and the rumen epithelial cells (REC) in particular, are directly exposed to high amounts of CLA. This study determined the effect of CLA on the fatty acid (FA) metabolism of REC and expression of genes known to be modulated by FA. Cultured REC were incubated with c9t11, t10c12, and the structurally similar FA linoleic acid (LA), oleic acid (OA), and *trans*-vaccenic acid (TVA) for 48 h at a concentration of 100 μ M. Cellular FA levels were determined by gas chromatography. Messenger RNA expression levels of stearoyl-CoA desaturase (*SCD*) and monocarboxylate transporter (*MCT*) 1 and 4 were quantified by reverse transcription-quantitative PCR. Fatty acid evaluation revealed significant effects of CLA, LA, OA, and TVA on the amount of FA metabolites of β -oxidation and elongation and of metabolites related to desaturation by *SCD*. The observed changes in FA content point (among others) to the ability of REC to synthesize c9t11 from TVA endogenously. The mRNA expression levels of *SCD* identified a decrease after CLA, LA, OA, or TVA treatment. In line with the changes in mRNA expression, we found reduced amounts of C16:1n-7 *cis*-9 and C18:1n-7 *cis*-9, the main products of *SCD*. The expression of *MCT1* mRNA increased after c9t11 and t10c12 treatment, and CLA c9t11 induced an upregulation of *MCT4*. Application of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α antagonist suggested that activation of PPAR α is involved in the changes of *MCT1*, *MCT4*, and *SCD* mRNA expression induced by c9t11. Participation of PPAR γ in the changes of *MCT1* and *SCD* mRNA expression was shown by the application of the respective

antagonist. The study demonstrates that exposure to CLA affects both FA metabolism and regulatory pathways within REC.

Key words: conjugated linoleic acid, rumen epithelium, stearoyl-CoA desaturase, monocarboxylate transporter, peroxisome proliferator-activated receptor

INTRODUCTION

Conjugated linoleic acids are known to have a wide range of physiological effects (Bhattacharya et al., 2006). They affect energy metabolism not only in humans (Salas-Salvadó et al., 2006) but also in ruminants (Odens et al., 2007). Thus, CLA have gained importance as feed additives in ruminants and, in particular, in lactating cows. As reviewed by Bauman et al. (2008), CLA *trans*-10,*cis*-12 (t10c12) in particular reduces milk fat synthesis in dairy cows, stabilizing the energy balance of the animal (Odens et al., 2007). The CLA *cis*-9,*trans*-11 (c9t11) isomer has been intensively studied because it is the predominant CLA in dairy products (Chin et al., 1992; Parodi, 1997) due to endogenous synthesis of this CLA (Corl et al., 2001). Commercially available mixtures of CLA, offered as feed additives for cows, mainly contain rumen-protected c9t11 and t10c12, and are aimed at initiating milk fat depression and thus stabilizing the health status of the cow at least at the onset of lactation. However, the study of Pappritz et al. (2011) revealed that only 5 to 40% of rumen-protected CLA reach the duodenum, depending on the protection method. Thus, it must be assumed that a large part of the CLA taken up orally are already released in the rumen. When CLA are released into the rumen fluid, their subsequent reduction (biohydrogenation) to *trans*-vaccenic acid (TVA; C18:1 *trans*-11) and stearic acid (C18:0; Harfoot and Hazlewood, 1997) may last up to 24 h (Troegeler-Meynadier et al., 2006). Thus, under these feeding conditions, the rumen epithelium may be exposed to a high CLA concentration, which may lead not only to CLA accumulation within the epithelium or release of CLA metabolism products but also to functional changes induced by CLA or their metabolites.

Received July 1, 2015.

Accepted December 11, 2015.

¹Corresponding author: franziska.masur@vetmed.uni-leipzig.de

To date, CLA accumulation and metabolism have been described in human vascular endothelial cells and smooth muscle cells (Müller et al., 2005; Ringseis et al., 2006; Eder and Ringseis, 2010). Regarding functional effects after CLA exposure, changes in stearoyl-CoA desaturase (**SCD**) status have been frequently described (Choi et al., 2001, 2002; Smith et al., 2002). In the rumen epithelium, SCD has not been detected to date. Stearoyl-CoA desaturase catalyzes the conversion of TVA to CLA (Grinari et al., 2000). Therefore, if the rumen epithelium could produce CLA endogenously from TVA catalyzed by SCD, this process would increase the amount of CLA that accumulates in rumen epithelial cells (**REC**) when CLA are added to the food. Presuming a modulation of SCD by CLA, accumulation of CLA in REC may also affect the amount of other products catalyzed by SCD.

We assumed that the accumulation of CLA might also have an effect on monocarboxylate transporter (**MCT**). In the rumen epithelium, the MCT1 isoform has been detected at the molecular and protein levels and has been shown to play a central role in mediating transruminal fluxes of short-chain fatty acids, including acetate, ketone bodies, and lactate (Müller et al., 2002; Graham et al., 2007; Dengler et al., 2014). Furthermore, activation of the peroxisome proliferator-activated receptor (**PPAR**) α pathway was demonstrated to lead to the effective upregulation of the MCT1 isoform in REC (König et al., 2008; Benesch et al., 2014). In turn, PPAR α is modulated by CLA, with c9t11 being the most active isomer (Moya-Camarena et al., 1999; Benjamin et al., 2005). In addition to the MCT1 isoform, the MCT4 isoform is also present in the rumen (Kirat et al., 2007). Although MCT4 regulatory pathways are not completely understood, research suggests that PPAR may play a role (Benesch et al., 2014).

Our objective was to expose cultured REC to CLA isoforms to better understand whether and how CLA accumulate in and exert effects on the cells. Cells were further exposed to linoleic acid (**LA**), oleic acid (**OA**), or TVA to distinguish between the effects of CLA and fatty acids (**FA**), which are structurally similar FA or precursors of endogenous CLA synthesis (Grinari et al., 2000). A further aim of our study was to investigate whether REC themselves express SCD and thus have the ability to desaturate the appropriate substrates, TVA in particular. Expression of SCD mRNA was determined by reverse-transcription quantitative PCR (**RT-qPCR**) to test if it can be influenced by CLA, LA, OA, or TVA. Monocarboxylate transporter 1 and MCT4 were seen as potential targets of CLA treatment and were therefore examined in detail. Finally, we attempted to elucidate the putative regulatory pathway

of CLA on *SCD*, *MCT1*, and *MCT4* through the application of PPAR α and PPAR γ antagonists.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female sheep (<1 yr) were fed with grass hay and water ad libitum for at least 2 wk. The animals were killed by captive-bolt stunning and subsequent exsanguination. These experiments were in accordance with German legislation on the protection of animals and were reported to the Landesdirektion Leipzig as T 88/13. After euthanasia, the abdomen was opened, and the atrium ruminis was excised and subjected to the cell isolation procedure.

Cell Culture and Treatment Procedure

Cultivation of REC followed the procedure described by Müller et al. (2000) and Benesch et al. (2014). Because all experiments were conducted on subcultured cells obtained from primarily isolated cells, the cells had to be isolated and cultured anew from each sheep slaughtered.

For that purpose, pieces of the excised atrium ruminis were kept on ice in Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free Dulbecco's PBS supplemented with 400 U/mL penicillin and 100 U/mL nystatin for 1 h. Thereafter, ruminal papillae were removed and subjected to fractional trypsinization as described by Gálfi et al. (1981). Division-active cells were found in fractions 3 and 4 (1 h of enzyme digestion per fraction). Isolated cells of those fractions were suspended in medium 199 containing 15% fetal bovine serum (**FBS**), 20 mM HEPES, 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamicin, and 2 mM L-glutamine and seeded at a density of 10^5 cells/ cm^2 in cell culture flasks (75 cm^2 ; Greiner Bio One, Frickenhausen, Germany). Incubation proceeded in a humidified 5% CO_2 air atmosphere at 37°C. Forty-eight hours after seeding, medium 199 was replaced with minimum essential Eagle's nutrient medium supplemented with 10% FBS, 20 mM HEPES, 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamicin, and 2 mM L-glutamine. Six to 9 d after seeding, primary cultured cells were subcultured to obtain consistent cell densities for mRNA and GC analysis. After detaching with trypsin-EDTA, cells were resuspended and seeded (seeding density: $2\text{--}3 \times 10^4$ cells/ cm^2) in cell culture flasks (75 cm^2 ; Greiner Bio One) for GC analysis, 12-well plates coated with collagen type I (Greiner Bio One) for mRNA analysis, and collagen type I-coated coverslips for immunocytochemical staining. The immunocytochemical staining was performed about 2 d after seeding using mouse-

anti-cytokeratin-5 antibody (BM6001P, polyclonal, dilution 1:100; Acris Antibodies, San Diego, CA) and goat-anti-vimentin antibody (sc-7557, polyclonal, dilution 1:300; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) to evaluate the suitability of the cell culture for the experiments. If cell cultures showed more than ~20% mesenchymal cells on the coverslips, all flasks and well plates from that isolation were discarded. If cell cultures consisted mainly of epithelial cells and cells were ~80% confluent, flasks and wells were treated with CLA, LA, OA, or TVA. All FA used were dissolved in ethanol to generate stock solutions at concentrations of 35.7 mM (10 mg/mL) for CLA and LA and 35.4 mM (10 mg/mL) for OA and TVA, which were added to low-serum medium containing minimum essential Eagle's nutrient medium supplemented with 5% FBS, 20 mM HEPES, and 2 mM L-glutamine. The final concentration of FA in the cell culture medium on 12-well plates was 100 μ M. In cell culture flasks, the final concentration was 100 μ M. Both CLA and TVA were additionally tested at a final concentration of 200 μ M in flasks. By MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay, all supplemented FA were proven to be noncytotoxic. Rumen epithelial cells treated with the appropriate volume of ethanol were used as controls. Exposure to FA or ethanol lasted for 48 h. For experiments on PPAR α and PPAR γ inhibition, cells were treated with 10 μ M GW 6471, a selective PPAR α antagonist (Xu et al., 2002), or with 10 μ M GW 9662, a selective PPAR γ antagonist (Lecsnitz et al., 2002) 4 h before treatment with 100 μ M c9t11 for 48 h. All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Munich, Germany) and PAA (Pasching, Austria) if not otherwise stated; CLA c9t11, t10c12, LA, TVA, and OA were obtained from Sigma-Aldrich with a purity of $\geq 96.0\%$ (HPLC grade) for CLA and $\geq 99.0\%$ (GC grade) for LA, TVA, and OA.

FA Extraction and Methylation

For FA analysis, subcultured cells obtained from 5 sheep were used for each experimental series (i.e., $N = 5$ biological replicates). Each treatment was tested once per cell culture per sheep (i.e., $n = 1$ technical replicate). Cells were cultured in culture flasks (75 cm²; Greiner Bio One). After exposing the cells to the treatments described above, approximately 1 to 10×10^6 cells per flask and treatment were detached by trypsinization and pelleted by centrifugation ($200 \times g$). Cells were washed by resuspending the cell pellet in PBS. To discard the supernatant, the cells were centrifuged again ($200 \times g$). The cell pellet was lysed with 1 mL of twice-distilled water and freeze-dried

overnight before extraction and methylation. We used a combined one-step extraction and esterification method as described by Sönnichsen and Müller (1999). The samples were treated with 0.5 mL of methanolic HCl (3 M), 0.25 mL of *n*-hexane, and 0.5 mL of an internal standard (0.8 mg of di-C17-phosphatidylcholine in 1 mL of methanol with 0.2% butylhydroxytoluol as an antioxidant) as previously described by Seidel et al. (2005). The reaction proceeded in a water bath at 85°C for 30 min. After cooling to room temperature, 0.5 mL of hexane was added to extract FAME as well as 1 mL of twice-distilled water for phase separation. The mixture was shaken (2,700 rpm) for 1 min. After centrifugation ($3,500 \times g$) for 10 min at 4°C, the upper hexane phase was separated and transferred to a new tube. The samples were evaporated with a gentle nitrogen flow at 37°C to dryness and dissolved in 0.06 mL of hexane.

GC Analysis

Separation and quantification of FAME were carried out using a Varian gas chromatograph 3800 equipped with a flame-ionization detector and with a 30-m fused-silica capillary column (Omegawax 320 GC Capillary Column, Supelco 24152) from Sigma-Aldrich. Helium 5.0 (purity: $\geq 99.999\%$) was used as carrier gas at a flow rate of 1.5 mL/min. The oven temperature was kept at 200°C isothermally for 40 min. The injector and detector temperatures were set at 250°C. Aliquots of 1 μ L were injected on column with a split ratio of 1:50. After 1 min, the split ratio was set to 1:100 for baseline optimization. After 20 min and 30 s, the split ratio was set to 1:3 (gas saver). Fatty acids were identified by comparing their retention time and mass spectra to FAME reference compounds recorded during this study. The following reference standards were used: Supelco 37 Component FAME Mix, PUFA No. 3, linoleic acid methyl ester mix, cis/trans and Omegawax Column Test Mix from Supelco (Bellefonte, PA); and Fim-Fame-6 quantitative mixture from Matreya LLC (State College, PA). In addition, GC-MS analysis was carried out using the identical chromatographic system as described above. The MS was operated in fullscan ($m/z = 50$ –500) mode using electron ionization. The acquired data were evaluated manually and by automatic deconvolution using AMDIS (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD). The AMDIS settings were simple mode; peak subtraction, 2; resolution, high; sensitivity, very high; and shape requirements, low. In both cases, identification was achieved by the NIST11 reference library (National Institute of Standards and Technology).

The Omegawax 320 column cannot separate *cis*- and *trans*-MUFA of the same chain length. Furthermore, n-9 and n-7 elute close to each other, leading to interfering FA. Consequently, C16:1n-9 was not separated from C16:1n-7 *trans*-9 after TVA treatment.

For quantification, response factors were determined from calibration curves of the Fim-Fame-6 quantitative mixture and pure compounds. For those FA not available as pure compounds, response factors were estimated from the nearest calibrated peak. The amount of each FA detected by GC was related to total protein. The total protein of each sample was determined using the bicinchoninic acid (BCA) assay (Smith et al., 1985). Data were thus expressed as medians (nmol) of each FA related to 1 mg of total protein.

RT-qPCR

For RT-qPCR, subcultured cells obtained from 6 sheep were used for each experimental series (i.e., $N = 6$ biological replicates). Each treatment was tested 3 times per cell culture per sheep (i.e., $N = 3$ technical replicates). Cells were cultured on 12-well plates. After exposing the cells to the treatments described above, isolation of total RNA was performed with an RNeasy Micro kit according to the manufacturer's protocol. To assess nucleic acid concentration and sample purity, the samples were diluted in H_2O and the absorbance at 230, 260, 280, and 320 nm was measured spectrophotometrically (Biophotometer; Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf, Germany). Each sample was checked for RNA degradation by electrophoresis in 1% agarose gels. Reverse transcription was performed with the GoScript Reverse Transcription System (Promega, Mannheim, Germany). Total RNA (1 μ g) and oligo (dT)₁₈ primer (1 μ L) were dissolved in H_2O to a total volume of 5 μ L and incubated at 70°C for 5 min, immediately chilled on ice for 5 min, and centrifuged for 10 s. Thereafter, 4 μ L of 5 \times reaction buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 20 U of ribonuclease inhibitor, 1 μ L of dNTP mix, and 1 μ L of reverse transcriptase were added to a total reaction volume of 20 μ L. This mixture was incubated at 25°C for 5 min, 42°C for 1 h and then for 5 min at 70°C to inactivate the reverse transcriptase. The cDNA was stored at -20°C until further use.

For RT-qPCR, primers (Supplemental Table S1; <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10042>) were designed based on sequences in the GenBank database using primer-BLAST tool (Ye et al., 2012). All primers were synthesized by Eurofins MWG (Ebersberg, Germany). The PCR products of the synthesized primer pairs were checked for specificity using agarose gel electrophoresis combined with sequencing. The obtained sequences were validated against the corresponding

National Center for Biotechnology Information (NCBI) database entries (Altschul et al., 1997). Reverse transcription-qPCR was performed using SYBR Green I and the Rotor-Gene 6000 system (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia). The SensiMix SYBR No-ROX Kit (Bioline, Luckenwalde, Germany) was used according to the manufacturer's protocol, with a final reaction volume of 20 μ L and a primer concentration of 112 nM. Each RT-qPCR run contained a no-template control with DNase-free water instead of cDNA. Melting curve analysis was performed at the end of each RT-qPCR reaction to confirm the amplification specificity. The reaction for each sample was performed in duplicate. Comparative quantitation analysis was performed using the Rotor-Gene Series Software 1.7 (Corbett Research) to determine the takeoff point and the amplification rate of each RT-qPCR reaction. Expression ratios were calculated using the relative expression software tool (REST2009, RG-Mode; Pfaffl et al., 2002) including a correction for reaction-specific amplification rate and normalization against the expression level of 2 averaged (geometric mean) reference genes, GAPDH and Na^+/K^+ -ATPase subunit α -1. The mean takeoff point and the mean amplification rate of control samples were used as calibrator sample. To present changes in the expression level of differently treated cells as mean fold changes compared with the control or to the c9t11 treatment, the control value or the value of the c9t11-treated cells was set to 1. Based on the takeoff point values, the expression of both reference genes was not different between the control and treated cells, and thus, between the control tissue and treated tissue samples, respectively.

FA Enzyme Indices

Fatty acid enzyme indices were calculated according to Peter et al. (2009) as FA product-to-precursor ratios of the individual FA amounts (nmol/mg of total protein) to indirectly determine the enzyme status of REC in combination with changes in mRNA expression. The SCD desaturation index was assessed as the ratio of C16:1n-7 *cis*-9 to C16:0 (**SCDI-16**) and C18:1n-9 *cis*-9 to C18:0 (**SCDI-18**). The FA elongation state was estimated from the elongation index (**EI**) as calculated by the ratio of C18:0 to C16:0 (Cedernaes et al., 2013). The SCDI-18 index was not determined for OA treatment because OA itself is part of the SCDI-18 calculation, which leads to biased results within the interpretation of desaturation rate. As described in the GC Analysis section, it was not possible to determine the amount of C16:1n-7 after TVA treatment. Therefore, SCDI-16 could not be calculated for TVA supplementation.

Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted based on biological replicates (N). Values obtained in the various technical replicates (n) were averaged. Data of biological replicates obtained by GC (Tables 1–3) differed from the normal distribution (Shapiro-Wilk test) and did not show equal variances (Levene's statistic) within the groups. Therefore, nonparametric tests were used to compare FA compositions after different FA treatments (Tables 1–3). Hence, the amounts of each FA were expressed as the median [quartile (Q)1, Q3], and the Kruskal-Wallis test was performed. For those FA that showed statistically significant differences after different FA treatments in the Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$), the Mann-Whitney U-test was computed as a post hoc test for comparison of the treated groups versus control. To counteract the problem of multiple comparisons, Bonferroni correction was conducted. Therefore, differences with $P < 0.0125$ (Table 1) were considered significant when both CLA isomers with supplementation of 100 and 200 μM each were compared with the control. For comparison of LA and OA with their control as well as for TVA with 100 and 200 μM versus control, $P < 0.025$ (Tables 2 and 3) was considered significant. Indices were considered normally distributed and analyzed by one-way ANOVA. For significant effects ($P < 0.05$), we proceeded with the Tukey post hoc test to find significant group differences. Statistical analysis was conducted with IBM SPSS statistics software (version 20 for Windows; IBM Corp., Armonk, NY).

Due to the nested design of the RT-qPCR analysis, the resulting biological variability and the technical noise at several "levels" of the experimental design was taken into account (Kitchen et al., 2010). To minimize the confounding variance and to accurately resolve the treatment effect based on biological replicates, we used multilevel regression analysis (Hox, 2010; Kitchen et al., 2010) for RT-qPCR analysis. The independent variable in each regression was the respective FA treatment. The dependent variable was always the relative mRNA expression (\log_2 transformed). All analyses were conducted using the software R and the lmer4 package (Bates et al., 2012).

RESULTS

Effects of CLA, LA, OA, and TVA on the FA Composition of REC

Changes in the amounts of the individual FA detected in REC both reflected the FA supplementation as well

as the metabolization of supplemented FA. Thus, each supplemented FA resulted in a corresponding increase of the amount in REC. Likewise, the amounts of the metabolites derived from the respective FA increased. Tables 1–3 represent the FA composition of REC exposed to CLA, LA, OA, and TVA for 48 h compared with untreated cells.

To evaluate the extent of accumulation of the supplemented FA in the cells compared with control, we summed the amounts of the metabolites detected and the amounts of the corresponding original FA. The corresponding metabolites were identified by the significant increase after the individual FA supplementation.

We detected 23 nmol/mg of total protein of Σ CLA + metabolites in control REC, whereas addition of 100 or 200 μM c9t11 led to 5.4- and 11.8-fold increases, respectively, of the amount of Σ CLA + metabolites. The addition of CLA t10c12 to the medium at 100 or 200 μM increased Σ CLA + metabolites by 9.6- and 20.1-fold, respectively.

When calculating the accumulation of TVA and its metabolites compared with control (Table 3), we summed not only the products of elongation and β -oxidation but also those of desaturation (as outlined in the section Confirmation of SCD Functionality in REC). Treatment with TVA at 100 or 200 μM increased Σ TVA + metabolites by 10.2- and 17.3-fold, respectively, compared with control cells. The addition of LA to the cell culture medium resulted in a 12.4-fold increase of Σ LA + metabolites, whereas exposure of the cells to OA led only to a small increase (1.8-fold) of Σ OA + metabolites. Beside changes in the supplemented FA and their metabolites, we also studied general changes of the FA composition of REC. The amount of Σ SFA in REC, which included even-numbered SFA ranging from C14:0 to C24:0, was not altered after exposure of REC to c9t11 and t10c12, LA, or OA. The TVA treatment tended to reduce Σ SFA ($P = 0.075$); this reduction was mainly due to a strong and significant reduction of the amount of C18:0 ($P = 0.01$; Table 3). To calculate Σ MUFA, we summed the Σ *cis* n-9 MUFA and the 4 FA as described in the Table 3 footnotes; Σ MUFA could not be calculated for TVA treatment for analytical reasons, as described in the GC Analysis section. Supplementation with CLA as well as LA and OA strongly affected Σ MUFA. Treatment with both CLA isomers and LA decreased Σ MUFA of REC primarily due to reductions in amounts of C16:1n-7 *cis*-9 and C18:1n-9 *cis*-9 (OA). The TVA treatment also decreased the amount of C18:1n-9 *cis*-9; therefore, we expected that Σ MUFA was as strongly affected after TVA treatment as after other FA treat-

Table 1. Effect of CLA *cis-9,trans-11* (c9t11) and *trans-10,cis-12* (t10c12) supplementation on fatty acid (FA) composition of cultured ruminal epithelial cells; results shown as medians with quartile (Q) 1 and Q3 in brackets

| FA (nmol/mg of total protein) | Medium supplementation ¹ | | | | | | P-value ² | | | | |
|---|-------------------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|-------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|------|---------------------------|--------|
| | CLA c9:11 | | | CLA t10:12 | | | | | | | |
| | Control | 100 μ M | 200 μ M | 100 μ M | 200 μ M | 200 μ M | | | | | |
| Σ SFA ³ | 178 | [166, 225] | 153 | [147, 173] | 160 | [136, 185] | 134 | [122, 183] | 115 | [108, 190] | 0.411 |
| C16:0 | 85.2 | [77.8, 103] | 76.8 | [75.1, 82.0] | 74.5 | [68.6, 90.4] | 57.1 | [55.6, 84.1] | 55.7 | [48.9, 94.0] | 0.436 |
| C18:0 | 85.3 | [71.1, 104] | 68.9 | [58.8, 77.9] | 70.7 | [56.1, 77.6] | 62.7 | [54.0, 81.6] | 48.6 | [45.5, 74.8] | 0.144 |
| Σ MUFA ⁴ | 281 | [264, 346] | 138 | [118, 154] ^{ns} | 146 | [116, 163] [*] | 127 | [112, 156] [*] | 107 | [104, 158] [*] | 0.012 |
| C16:1n-7 <i>cis</i> -9 | 11.4 | [10.2, 13.2] | 5.84 | [4.68, 7.38] [*] | 5.69 | [5.13, 8.35] [*] | 4.37 | [4.09, 7.36] [*] | 4.72 | [4.19, 7.36] [*] | 0.012 |
| C18:1n-9 <i>cis</i> -9 | 216 | [190, 270] | 93.6 | [81.0, 103] [*] | 90.0 | [78.2, 104] [*] | 91.0 | [81.1, 105] [*] | 76.6 | [73.8, 98.4] [*] | 0.011 |
| Σ <i>cis</i> n-9 MUFA ⁶ | 238 | [209, 296] | 112 | [96.4, 118] [*] | 110 | [94.2, 125] [*] | 105 | [93.1, 119] [*] | 89.4 | [84.3, 116] [*] | 0.010 |
| Σ CLA + metabolites ⁷ | 23.3 | [18.1, 27.6] | 156 | [138, 186] [*] | 273 | [213, 387] [*] | 221 | [195, 323] [*] | 462 | [360, 579] [*] | <0.001 |
| C16:2n-7 <i>cis</i> -7, <i>trans</i> -9/Unknown 2 | 19.3 | [14.5, 25.4] | 29.8 | [27.0, 36.2] | 53.7 | [42.2, 73.1] [*] | 11.7 | [9.57, 16.3] | 10.5 | [8.55, 14.3] | <0.001 |
| C18:2n-7 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 | 0.99 | [0.71, 1.30] | 110 | [97.7, 129] [*] | 190 | [130, 267] [*] | 3.70 | [2.73, 5.35] [*] | 4.33 | [3.56, 9.07] [*] | <0.001 |
| C20:2n-7 <i>cis</i> -11, <i>trans</i> -13 | ND ⁸ | | 6.48 | [5.03, 7.78] [*] | 9.79 | [6.94, 10.1] [*] | ND | | ND | | 0.001 |
| C22:2n-7 <i>cis</i> -13, <i>trans</i> -15 | ND | | 0.59 | [0.43, 0.87] [*] | 0.74 | [0.56, 1.04] [*] | ND | | ND | | <0.001 |
| C14:2n-6 <i>trans</i> -6, <i>cis</i> -8 | 0.15 | [0.07, 3.50] | 0.08 | [0.04, 0.26] | 0.06 | [0.00, 3.65] | 6.78 | [5.50, 8.80] | 18.8 | [13.9, 22.3] [*] | 0.001 |
| C16:2n-6 <i>trans</i> -8, <i>cis</i> -10 | ND | | 0.16 | [0.00, 0.26] | 0.51 | [0.00, 0.98] | 29.9 | [24.5, 48.2] [*] | 47.3 | [44.6, 76.0] [*] | <0.001 |
| C18:2n-6 <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 | ND | | 1.11 | [1.07, 5.69] [*] | 3.92 | [2.44, 7.72] [*] | 148 | [123, 215] [*] | 329 | [238, 397] [*] | <0.001 |
| C20:2n-6 <i>cis</i> -12, <i>trans</i> -14 | ND | | ND | | ND | | 12.17 | [8.10, 15.1] [*] | 20.9 | [18.6, 27.0] [*] | <0.001 |
| C22:2n-6 <i>trans</i> -14, <i>cis</i> -16 | ND | | ND | | ND | | 0.91 | [0.55, 1.09] [*] | 1.14 | [0.86, 1.60] [*] | <0.001 |
| CLA <i>trans,trans</i> | 0.53 | [0.23, 0.92] | 7.39 | [6.29, 10.4] [*] | 23.4 | [18.6, 30.9] [*] | 16.3 | [11.0, 18.6] [*] | 33.2 | [24.1, 37.1] [*] | <0.001 |
| Σ PUFA ⁹ | 71.3 | [54.0, 86.7] | 45.4 | [42.9, 53.2] | 47.0 | [39.2, 56.6] | 50.9 | [46.7, 70.6] | 49.6 | [47.0, 69.8] | 0.088 |
| Σ n-3 ¹⁰ | 18.2 | [13.7, 24.8] [*] | 13.2 | [12.0, 15.9] | 14.1 | [10.6, 16.0] | 15.3 | [12.4, 20.6] | 14.4 | [12.9, 20.9] | 0.426 |
| Σ n-6 ¹¹ | 44.2 | [32.0, 49.7] | 27.7 | [26.1, 31.8] | 26.7 | [21.0, 35.1] | 29.2 | [29.0, 44.1] | 30.5 | [28.6, 42.1] | 0.072 |
| Unknown 1 | 29.2 | [21.5, 37.5] | 18.5 | [14.7, 21.2] | 15.6 | [13.4, 21.3] | 18.1 | [15.2, 25.7] | 16.2 | [13.1, 22.1] | 0.110 |
| C16:2n-7 <i>cis</i> -6, <i>trans</i> -9/Unknown 3 | 6.01 | [5.29, 8.44] | 4.28 | [4.01, 4.65] [*] | 4.65 | [3.91, 5.08] | 4.73 | [4.15, 7.31] | 4.77 | [4.10, 6.99] | 0.090 |
| Σ total ¹² | 639 | [549, 785] | 532 | [518, 592] | 627 | [580, 866] | 580 | [541, 791] | 805 | [718, 1,013] | 0.001 |

¹Medium of cultured ruminal epithelial cells was supplemented with either 100 or 200 μ M of CLA c9t11 or CLA t10c12.

²Kruskal-Wallis test was performed to identify differences between the medians of the differently supplemented groups (N = 5). $P < 0.05$ was considered significant.

³ Σ SFA = C14:0 + C16:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0 + C24:0.

⁴ Σ MUFA = Σ *cis* n-9 MUFA + C16:1n-7 + C18:1n-7 + C20:1n-7 + C22:1n-11.

⁵Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction was performed to identify the potential differences between the supplemented groups and the control group when the Kruskal-Wallis test indicated significant differences; * $P < 0.0125$ was considered significant.

⁶ Σ *cis* n-9 MUFA = C16:1n-9 + C18:1n-9 + C20:1n-9 + C22:1n-9 + C24:1n-9.

⁷ Σ CLA + metabolites = C16:2n-7 + CLA c9t11 + C20:2n-7 + C22:2n-7 + C14:2n-6 + C16:2n-6 + CLA t10c12 + C20:2n-6 + C22:2n-6 + CLA *trans,trans*.

⁸ND = not detectable; concentrations were <0.05 nmol/mg of total protein.

⁹ Σ PUFA = C16:4n-1 + C20:3n-9 + C22:2n-9 + Σ n-3 + Σ n-6.

¹⁰ Σ n-3 = C18:3n-3 + C20:3n-3 + C22:5n-3 + C22:6n-3.

¹¹ Σ n-6 = C18:2n-6 + C20:2n-6 + C22:4n-6 + C24:2n-6.

¹²In total, 49 FA were determined and summed.

ments, even though Σ MUFA was not determined. In contrast to CLA, LA, and TVA treatments, Σ MUFA increased ($P = 0.002$) in OA-treated cells because the added FA and their metabolites are themselves MUFA.

The sum of PUFA was calculated as the sum of Σ n-3, Σ n-6, and the 3 other FA described in the table footnotes. Due to the addition of LA, Σ PUFA increased in the respectively treated cells ($P = 0.008$). None of the other treatments affected Σ PUFA.

In addition to changes in the amounts of clearly defined FA, we detected changes in amounts of an FA whose structure we could not definitely determine (FA Unknown 1, Unknown 2, and Unknown 3, see Supple-

mental Materials and Tables S2, S3, and S4; <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10042>).

Although changes were evident in the amounts of the individual FA and FA groups calculated, the total amount of FA (Σ total) was either not changed or only slightly changed (Tables 1–3). As shown in Table 3, only treatment with TVA at 200 μ M led to an increase of Σ total in REC ($P = 0.018$).

Confirmation of SCD Functionality in REC

Stearoyl-CoA desaturase could be detected on the mRNA level. The suggestion of an active SCD can be

Table 2. Effect of linoleic and oleic acid supplementation on fatty acid (FA) composition of cultured ruminal epithelial cells; results shown as medians with quartile (Q) 1 and Q3 in brackets

| | Medium supplementation ¹ | | | | | | |
|---|-------------------------------------|--------------|------------------|---------------------------|------------------|---------------|----------------------|
| FA (nmol/mg of total protein) | Control | | LA (100 μ M) | | OA (100 μ M) | | P-value ² |
| Σ SFA ³ | 181 | [138, 215] | 169 | [143, 201] | 141 | [119, 162] | 0.275 |
| C16:0 | 87.8 | [60.0, 95.7] | 72.4 | [58.2, 95.3] | 67.6 | [55.9, 82.3] | 0.733 |
| C18:0 | 77.3 | [64.3, 99.7] | 81.6 | [73.6, 88.6] | 61.8 | [52.5, 67.8] | 0.046 |
| Σ MUFA ⁴ | 233 | [220, 259] | 107 | [95.4, 113]* ⁵ | 372 | [326, 398]* | 0.002 |
| C16:1n-7 <i>cis</i> -9 | 9.33 | [8.26, 12.1] | 3.84 | [3.62, 4.38]* | 4.98 | [3.69, 6.91]* | 0.007 |
| C16:1n-9 <i>cis</i> -7 | 7.04 | [5.92, 8.22] | 5.23 | [4.70, 6.64] | 23.5 | [19.9, 29.1]* | 0.004 |
| C18:1n-9 <i>cis</i> -9 | 179 | [168, 197] | 68.7 | [56.2, 70.8]* | 286 | [252, 303]* | 0.002 |
| C20:1n-9 <i>cis</i> -11 | 6.34 | [5.13, 6.65] | 4.87 | [3.38, 5.37] | 19.2 | [17.3, 22.2]* | 0.004 |
| C22:1n-9 <i>cis</i> -13 | 1.05 | [0.88, 1.32] | 1.51 | [0.93, 1.66] | 4.39 | [3.78, 5.52]* | 0.006 |
| C24:1n-9 <i>cis</i> -15 | 2.67 | [2.27, 3.41] | 2.43 | [2.03, 3.33] | 7.19 | [6.81, 7.57]* | 0.009 |
| Σ <i>cis</i> n-9 MUFA ⁶ | 196 | [184, 214] | 83.6 | [67.2, 87.4]* | 345 | [302, 362]* | 0.002 |
| Σ PUFA ⁷ | 82.3 | [65.5, 112] | 397 | [276, 463]* | 65.0 | [59.2, 85.8] | 0.008 |
| C18:2n-6 | 27.6 | [21.3, 40.8] | 302 | [208, 338]* | 21.4 | [19.5, 30.7] | 0.008 |
| C20:2n-6 | 0.96 | [0.74, 1.66] | 48.8 | [30.3, 68.1]* | 1.40 | [1.02, 1.86] | 0.007 |
| C22:2n-6 | ND ⁸ | | 3.96 | [1.96, 4.82]* | ND | | 0.001 |
| C24:2n-6 | ND | | 4.21 | [2.56, 5.91]* | ND | | 0.001 |
| C18:3n-6 | 0.56 | [0.47, 0.86] | 0.93 | [0.86, 1.20] | 0.66 | [0.48, 0.71] | 0.018 |
| Σ n-3 ⁹ | 23.0 | [18.4, 32.7] | 18.0 | [15.6, 23.2] | 18.5 | [17.8, 26.9] | 0.482 |
| Σ n-6 ¹⁰ | 52.1 | [38.7, 71.5] | 376 | [258, 438]* | 39.6 | [37.6, 55.7] | 0.008 |
| Unknown 1 | 29.9 | [26.1, 36.3] | 24.9 | [20.8, 28.8] | 20.3 | [17.0, 27.6] | 0.093 |
| C16:2n-7 <i>cis</i> -7, <i>trans</i> -9/Unknown 2 | 20.7 | [19.3, 26.0] | 14.7 | [12.6, 17.3]* | 14.9 | [11.6, 18.7] | 0.013 |
| Σ LA + metabolites ¹¹ | 29.0 | [22.0, 42.2] | 359 | [243, 417]* | 22.4 | [20.9, 32.4] | 0.008 |
| Σ OA + metabolites ¹² | 207 | [196, 207] | 97.9 | [77.2, 99.3]* | 371 | [324, 392]* | 0.002 |
| C16:2n-7 <i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9 | 11.0 | [10.3, 12.3] | 11.4 | [9.99, 13.5] | 26.3 | [21.9, 29.9]* | 0.008 |
| Σ total ¹³ | 570 | [535, 660] | 737 | [595, 839] | 682 | [573, 722] | 0.137 |

¹Medium of cultured ruminal epithelial cells was supplemented with 100 μ M linoleic acid (LA) or oleic acid (OA).

²Kruskal-Wallis test was performed to identify differences between the medians of the differently supplemented groups ($N = 5$); $P < 0.05$ was considered significant.

³ Σ SFA = C14:0 + C16:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0 + C24:0.

⁴ Σ MUFA = Σ *cis* n-9 MUFA + C16:1n-7 + C18:1n-7 + C20:1n-7 + C22:1n-11.

⁵Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction was performed to identify the potential differences between the supplemented groups and the control group when the Kruskal-Wallis test indicated significant differences; * $P < 0.025$ was considered significant.

⁶ Σ *cis* n-9 MUFA = 16:1n-9 + 18:1n-9 + 20:1n-9 + 22:1n-9 + 24:1n-9.

⁷ Σ PUFA = C16:4n-1 + C20:3n-9 + C22:2n-9 + Σ n-3 + Σ n-6.

⁸ND = not detectable; concentrations were <0.05 nmol/mg of total protein.

⁹ Σ n-3 = C18:3n-3 + C20:3n-3 + C20:5n-3 + C22:5n-3 + C22:6n-3.

¹⁰ Σ n-6 = C18:2n-6 + C18:3n-6 + C20:2n-6 + C20:3n-6 + C20:4n-6 + C22:2n-6 + C22:4n-6 + C24:2n-6.

¹¹ Σ LA + metabolites = C18:2n-6 + C20:2n-6 + C22:2n-6 + C24:2n-6.

¹² Σ OA + metabolites = Σ *cis* n-9 MUFA + C16:2n-7 *cis*-6, *cis*-9.

¹³In total, 49 FA were determined and summed.

Table 3. Effect of *trans*-vaccenic acid supplementation on fatty acid (FA) composition of cultured ruminal epithelial cells; results shown as medians with quartile (Q) 1 and Q3 in brackets

| FA (nmol/mg of total protein) | Medium supplementation ¹ | | | | | | <i>P</i> -value ² |
|---|-------------------------------------|--------------|-----------------|---------------|--------------|----------------------------|------------------------------|
| | Control | | TVA (100 μM) | | TVA (200 μM) | | |
| Σ SFA ³ | 181 | [153, 214] | 135 | [110, 202] | 124 | [100, 135] | 0.075 |
| C16:0 | 87.8 | [73.0, 105] | 79.3 | [62.9, 118] | 76.4 | [58.8, 83.6] | 0.357 |
| C18:0 | 77.8 | [67.1, 91.6] | 40.4 | [35.1, 62.4] | 32.8 | [29.6, 34.8]* ⁴ | 0.010 |
| Σ MUFA ⁵ | 253 | [230, 318] | NC ⁶ | | NC | | |
| C18:1n-9 <i>cis</i> -9 | 195 | [178, 241] | 129 | [105, 179] | 86.6 | [74.6, 106]* | 0.006 |
| Σ <i>cis</i> n-9 MUFA ⁷ | 208 | [188, 254] | 139 | [112, 192] | 92.9 | [81.5, 114]* | 0.008 |
| C16:1n-7 <i>trans</i> -9 | ND ⁸ | | 77.7 | [53.7, 115]* | 130 | [110, 154]* | 0.004 |
| C18:1n-7 <i>trans</i> -11 | ND | | 152 | [116, 239]* | 291 | [239, 365]* | 0.003 |
| C20:1n-7 <i>trans</i> -13 | ND | | 5.05 | [3.47, 8.04]* | 7.97 | [6.99, 9.65]* | 0.004 |
| C24:1n-7 <i>trans</i> -17 | ND | | 1.97 | [1.38, 3.22]* | 2.37 | [2.05, 3.00]* | 0.008 |
| Σ <i>trans</i> n-7 MUFA ⁹ | NC | | 213 | [186, 366]* | 436 | [362, 526]* | 0.003 |
| Σ CLA + metabolites ¹⁰ | 26.1 | [20.3, 27.5] | 101 | [83.0, 146]* | 125 | [109, 131]* | 0.005 |
| C16:2n-7 <i>cis</i> -7, <i>trans</i> -9/Unknown 2 | 24.2 | [19.3, 26.2] | 22.3 | [20.0, 36.3] | 19.2 | [18.3, 24.2] | 0.468 |
| C18:2n-7 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 | 0.90 | [0.79, 1.19] | 63.5 | [56.1, 101]* | 88.3 | [76.9, 97.9]* | 0.006 |
| C20:2n-7 <i>cis</i> -11, <i>trans</i> -13 | ND | | 2.73 | [2.23, 4.05]* | 2.81 | [2.63, 3.00]* | 0.007 |
| C18:2n-6 <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 | ND | | 0.82 | [0.73, 1.67]* | 1.94 | [1.00, 2.41]* | 0.004 |
| CLA <i>trans,trans</i> | 0.46 | [0.21, 0.51] | 3.59 | [2.53, 8.29]* | 10.5 | [4.46, 11.0]* | 0.006 |
| Σ PUFA ¹¹ | 82.3 | [67.9, 88.7] | 69.2 | [65.8, 129] | 72.8 | [65.8, 86.2] | 0.827 |
| Σ n-3 ¹² | 23.0 | [17.5, 25.0] | 21.3 | [18.8, 36.5] | 20.0 | [13.3, 25.8] | 0.970 |
| Σ n-6 ¹³ | 52.1 | [41.3, 54.2] | 42.3 | [39.8, 82.3] | 44.3 | [41.2, 54.4] | 0.914 |
| Unknown 1 | 28.0 | [26.1, 38.5] | 24.0 | [21.9, 34.7] | 20.5 | [16.4, 24.0]* | 0.026 |
| C16:2n-7 <i>cis</i> -6, <i>trans</i> -9/Unknown 3 | 7.06 | [6.08, 8.31] | 27.1 | [23.7, 50.5]* | 27.8 | [23.2, 32.6]* | 0.009 |
| Σ TVA + metabolites ¹⁴ | 33.2 | [26.4, 35.8] | 337 | [295, 561]* | 573 | [512, 680]* | 0.005 |
| Σ total ¹⁵ | 613 | [541, 738] | 724 | [665, 1,160] | 934 | [844, 1,082]* | 0.018 |

¹Medium of cultured ruminal epithelial cells was supplemented with 100 or 200 μ M *trans*-vaccenic acid (TVA).²Kruskal-Wallis test was performed to identify differences between the medians of the differently supplemented groups (N = 5); *P* < 0.05 was considered significant.³ Σ SFA = C14:0 + C16:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0 + C24:0.⁴Mann-Whitney U test with Bonferroni correction was performed to identify the potential differences between the supplemented groups and the control group when the Kruskal-Wallis test indicated significant differences; **P* < 0.025 was considered significant.⁵ Σ MUFA = Σ *cis* n-9 MUFA + Σ *trans* n-7 MUFA.⁶NC = not calculated.⁷ Σ *cis* n-9 MUFA = 18:1n-9 + 20:1n-9 + 22:1n-9 + 24:1n-9.⁸ND = not detectable; concentrations were <0.05 nmol/mg of total protein.⁹ Σ *trans* n-7 MUFA = C16:1n-7 + C18:1n-7 + C20:1n-7 + C22:1n-11.¹⁰ Σ CLA + metabolites = C16:2n-7 + CLA *cis*-9,*trans*-11 + C20:2n-7 + CLA *trans*-10,*cis*-12 + CLA *trans,trans*.¹¹ Σ PUFA = C16:4n-1 + C20:3n-9 + C22:2n-9 + Σ n-3 + Σ n-6.¹² Σ n-3 = C18:3n-3 + C20:3n-3 + C22:5n-3 + C22:6n-3.¹³ Σ n-6 = C18:2n-6 + C18:3n-6 + C20:3n-6 + C20:4n-6 + C22:2n-6 + C22:4n-6 + 24:2n-6.¹⁴ Σ TVA + metabolites = Σ *trans* n-7 MUFA + Σ CLA + metabolites + C16:2n-7 *cis*-6,*trans*-9.¹⁵In total, 49 FA were determined and summed.

derived from the observation that addition of TVA at 100 and 200 μ M led to a concentration-dependent increase in the amount of c9t11 (Figure 1). In control cells, only 0.90 nmol of c9t11/mg of total protein was detected compared with 63.5 or 88.3 nmol of c9t11/mg of total protein in TVA-treated cells. After TVA treatment, the amount of c9t11 was only slightly lower than that in cells exposed to 100 μ M c9t11 directly (63.5 and 88.3 nmol of c9t11/mg of total protein in 100 and 200 μ M TVA-treated cells, respectively, compared with 110.4 nmol of c9t11/mg of total protein in cells treated with 100 μ M c9t11).

Effects of CLA, LA, OA, and TVA on mRNA Expression of SCD in REC and Corresponding Changes in SCDI

All FA applied induced significant effects on *SCD* mRNA expression (Figure 2). Compared with the untreated control, mRNA expression of *SCD* was decreased after treatment with each FA (*P* < 0.01). The extent of downregulation ranged from 2-fold after TVA treatment to 5.3-fold after t10c12 and LA treatments. In line with these results, we found a decrease in SCDI-16 and SCDI-18 compared with that of the control af-

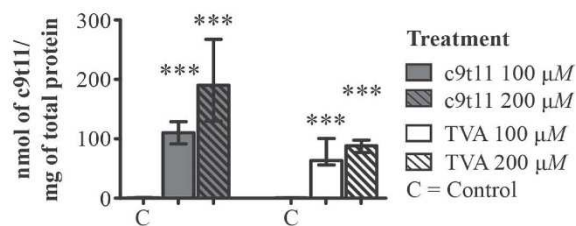


Figure 1. Accumulation of CLA *cis*-9,*trans*-11 (c9t11) in cultured ruminal epithelial cells treated with either CLA c9t11 or *trans*-vaccenic acid (TVA) at 100 or 200 μ M for 48 h. Cells treated with equivalent amounts of ethanol served as the control. The amount of CLA c9t11 is presented as the median with an interquartile range of N = 5 animals (in nmol/mg of total protein). The asterisks indicate significant differences compared with the control value, which is close to zero and therefore not visible in the figure (*** P < 0.001; Mann-Whitney U-test).

ter each FA treatment except for treatment with TVA (panels A and B in Figure 3). Both CLA isomers added to the medium reduced SCDI-16 by approximately 40% (P < 0.001) and SCDI-18 by approximately 50% (P < 0.001) relative to the control. Exposure of the cells to LA led to a 58% reduction of SCDI-16 (P < 0.001) and a 65% reduction of SCDI-18 (P < 0.001) compared with their controls. Reduction of SCDI-16 caused by OA addition was similar to the alterations observed after CLA addition. We found no difference in SCDI-18 between control and TVA treatment (P = 0.57), but the result has to be seen in context with the effect of TVA treatment in EI. Whereas EI was not altered after CLA, LA, and OA treatment (data not shown), a difference between control and TVA treatment (P < 0.001) could be detected (Figure 3C).

Effects of CLA, LA, OA, and TVA on mRNA Expression of *MCT1* and *MCT4* in REC

To evaluate the effect of the applied FA on *MCT1* and *MCT4*, we analyzed their mRNA levels. Regarding *MCT1*, we observed a difference in mRNA expression between control and CLA-treated cells (Figure 2). Expression of *MCT1* was upregulated 1.2- and 1.3-fold by CLA c9t11 and t10c12, respectively, compared with their controls. Supplementing TVA likewise caused an upregulation of *MCT1* mRNA expression (1.4-fold, P = 0.03). Linoleic acid increased *MCT1* mRNA level 1.4-fold (P = 0.04). The slight nominal increase of *MCT1* mRNA expression induced by OA was not significant (P = 0.08 compared with control). Expression of *MCT4* was also significantly upregulated in REC after treatment with CLA c9t11, and CLA t10c12 tended to increase the mRNA level (P = 0.06). In REC treated with c9t11, we detected a 1.4-fold increase of *MCT4*

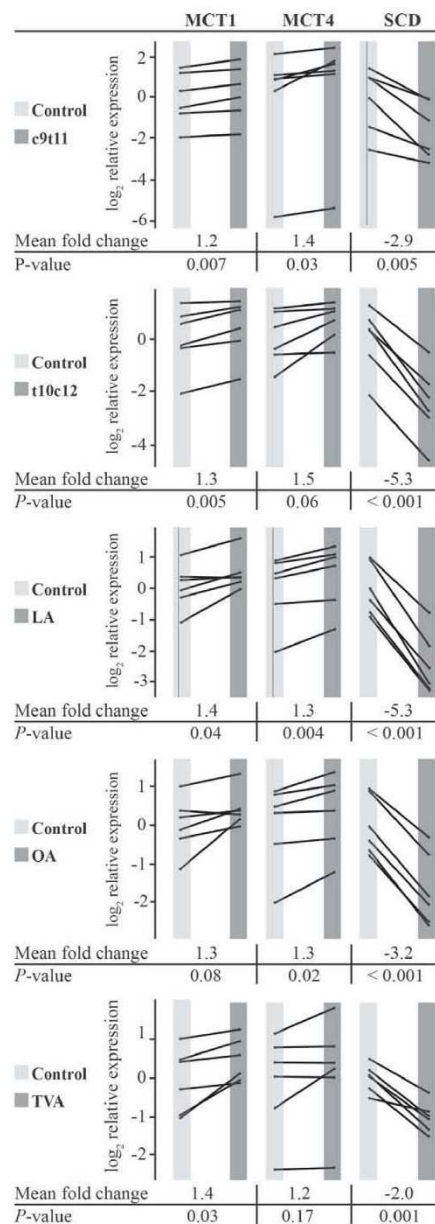


Figure 2. Relative mRNA expression of monocarboxylate transporter (*MCT*) 1, *MCT4*, and stearoyl-CoA desaturase (*SCD*) from cultured ruminal epithelial cells treated with CLA *cis*-9,*trans*-11 (c9t11), CLA *trans*-10,*cis*-12 (t10c12), linoleic acid (LA), oleic acid (OA), or *trans*-vaccenic acid (TVA) for 48 h. The mRNA expression values (\log_2 transformed) are expressed relative to the calibrator sample. Each graph represents the treatment effect within one animal; *GAPDH* and Na⁺/K⁺-ATPase subunit α -1 were used as reference genes. The mean fold change is calculated compared with control (N = 6). P < 0.05 was considered significant (multilevel regression analysis).

mRNA ($P = 0.03$); LA and OA likewise increased *MCT4* mRNA expression (1.3-fold both, $P = 0.004$ and $P = 0.02$ respectively). Exposure to TVA had no influence on *MCT4* mRNA expression in REC ($P = 0.17$).

Effects of c9t11 in the Presence and Absence of PPAR α and PPAR γ Antagonists

To explore the involvement of PPAR α and PPAR γ in the action of c9t11 on mRNA expression of *MCT1*, *MCT4*, and *SCD*, cells were treated with or without selective PPAR α antagonist GW6471 and PPAR γ antagonist GW9662 for 4 h before treatment with 100 μ M c9t11. The c9t11-induced downregulation of *SCD* mRNA as shown in Figure 2 was further enhanced by pretreatment with the PPAR α antagonist GW6471 ($P < 0.001$; Figure 4), indicating that activation of PPAR α might attenuate the depressive effect of c9t11 on *SCD* mRNA expression. Antagonizing PPAR γ by GW9662 also decreased the *SCD* mRNA level ($P = 0.04$) but only 1.5-fold compared with 5.5-fold with PPAR α antagonist.

Expression of *MCT4* also indicated that PPAR α at least partially attenuates the activation of other pathways induced by CLA. The enhanced mRNA expression of *MCT4* already observed after c9t11 treatment

was further enhanced after antagonizing PPAR α with GW 6471 ($P = 0.047$). Pretreatment with GW9662, the PPAR γ antagonist, had no effect on *MCT4* mRNA expression ($P = 0.44$). The c9t11-induced upregulation of *MCT1* mRNA expression decreased (1.4-fold) after treatment with either the PPAR α or PPAR γ antagonist ($P = 0.04$ for both).

DISCUSSION

Accumulation and Metabolization of CLA and Structurally Similar FA

Medium supplementation with CLA, LA, OA, and TVA induced remarkable changes in the FA composition of cultured REC. After exposure, all supplemented FA were not only increased in REC but also metabolized by the cells. From the data shown in Tables 1–3, we could clearly identify the metabolites of each supplemented FA. The predominant metabolites we detected in our cells were products of β -oxidation (C16:1 and C16:2) and elongation (C20:1 and C20:2, C22:1 and C22:2). A similar metabolic pattern (i.e., β -oxidation and elongation) after CLA treatment was found in microsomal fractions from mouse liver and cultivated macrophages (Park et al., 2005) as well as vascular

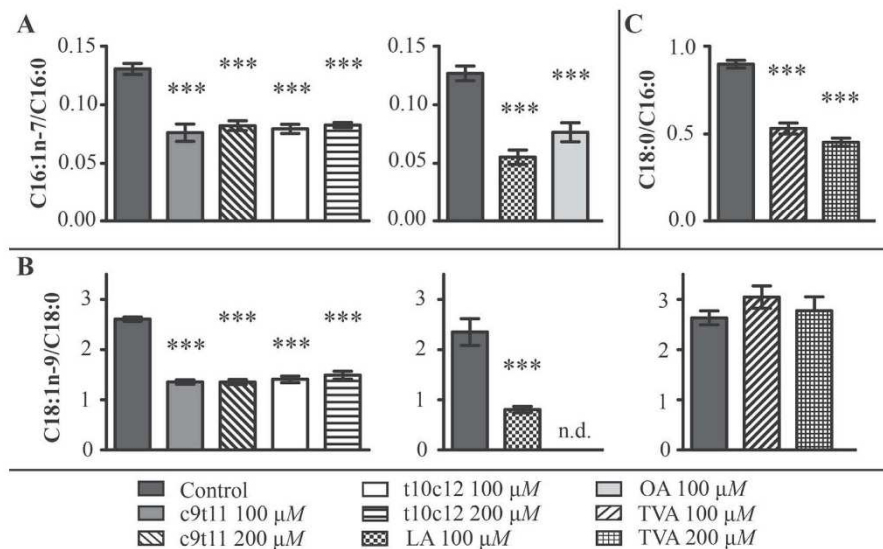


Figure 3. (A) Stearoyl-CoA desaturase (SCD) index assessed as 16:1n-7/C16:0 (SCDI-16) of untreated cells (control) versus cells treated with CLA *cis*-9,*trans*-11 (c9t11), CLA *trans*-10,*cis*-12 (t10c12), linoleic acid (LA), oleic acid (OA), or *trans*-vaccenic acid (TVA) for 48 h. (B) SCD index assessed as 18:1n-9/C18:0 (SCDI-18) of control versus cells treated with CLA c9t11, CLA t10c12, LA, OA and TVA. (C) Elongation index (EI) assessed as C18:0/C16:0 of untreated cells versus TVA treated cells. In all panels, indices are shown as the mean \pm SEM of $N = 5$ animals. The asterisks indicate significant differences compared with the control (***) $P < 0.001$; ANOVA and Tukey test; n.d. = not determined).

smooth muscle cells (Müller et al., 2005) and various leukemia cells (Agatha et al., 2004). Thus, CLA seem to be metabolized by the same metabolic pathways in REC as in other cells.

In comparing CLA and LA, they seem to be largely degraded to the same products. Oleic acid and TVA are also primarily metabolized by β -oxidation and elongation. Additionally, OA and TVA and their metabolites (i.e., MUFA) may serve as substrates for desaturases. We identified C16:2n-7 *cis*-7,*cis*-9 as an SCD product of C16:1n-9 *cis*-7 (β -oxidation product of OA; Table 2) and C16:2n-7 *cis*-6,*trans*-9 as a Δ^6 -desaturase product of C16:1n-7 *trans*-9 (β -oxidation product of TVA; Table 3). The most important metabolite of SCD-mediated desaturation (Corl et al., 2001) in TVA-treated cells was c9t11. Rumen epithelial cells are therefore able to produce CLA endogenously (Figure 1), similar to Caco-2 cells (Reynolds et al., 2008), bovine adipocytes (Kadegowda et al., 2013), and bovine and human mammary epithelium (Grinari et al., 2000; Mosley et al., 2006).

The CLA metabolites in cultured REC treated with 100 or 200 μ M CLA are important for evaluating the biological effects of CLA. Park et al. (2005) showed that the CLA metabolites C20:2n-7 *cis*-11,*trans*-13 and C20:2n-6 *trans*-12,*cis*-14 alter heparin-releasable lipoprotein lipase activity as well as lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. These metabolites were found in REC after CLA administration. We can therefore assume that REC functionality is altered in a similar way not only by the CLA tested but also by their metabolites. Furthermore, not only the administered CLA may exert alterations but also the endogenously synthesized c9t11 built from TVA by SCD.

Alteration of SCD mRNA Level and Desaturation Indices

As shown in Figure 2, mRNA expression of *SCD* was significantly downregulated after 48 h of treatment with CLA, LA, OA, or TVA. This is in accordance with studies in bovine mammary epithelial cells (Kadegowda et al., 2009). The changes in mRNA expression were probably followed by an alteration of SCD abundance or activity. Results of FA analysis and index calculation provide evidence for this assumption. Both CLA isomers as well as LA led to a decreased amount of C16:1 *cis*-9 and OA (Tables 1 and 2). As a result, the calculated SCDI-16 and SCDI-18 were decreased (panels A and B in Figure 3). In contrast to CLA, LA, and OA treatments (where the decreased SCD indices coincided with decreased *SCD* mRNA levels), TVA treatment decreased *SCD* mRNA expression (Figure 2) but seemed to have no effect on SCDI (Figure 3B). This contradiction may be explained by the observation that TVA treatment also altered other metabolic pathways, whereas CLA, LA, and OA did not exert this effect. Additional TVA-induced alterations may be derived from the calculation of EI, which very likely reflects FA elongase 6 (ELOVL-6) pathway. Elongase 6 is responsible for the elongation of C16:0 to C18:0 in mammals (Leonard et al., 2004) and is known to be co-regulated with SCD (Wang et al., 2006). Whereas EI was unchanged in cell cultures treated with CLA, LA, and OA (data not shown), it was significantly reduced in the TVA-treated cells compared with that of the control (Figure 3C). Resulting from the decreased EI, the amount of C18:0 (i.e., the substrate of SCD) was also diminished. Consequently, we can assume that the

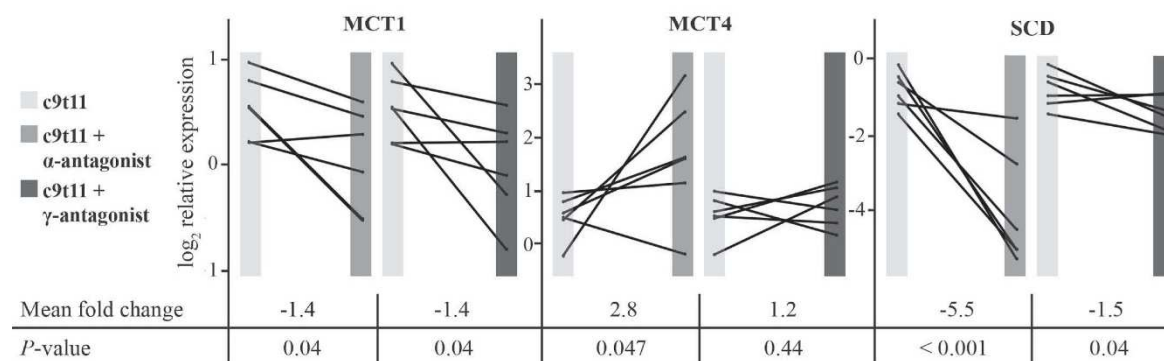


Figure 4. Relative mRNA expression of monocarboxylate transporter (*MCT*) 1, *MCT*4, and stearoyl-CoA desaturase (*SCD*) on cultured ruminal epithelial cells treated with CLA *cis*-9,*trans*-11 (c9t11) alone for 48 h or in combination with peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α (α -antagonist) or PPAR γ antagonist (γ -antagonist). The mRNA expression values (\log_2 transformed) are expressed relative to the calibrator sample. Each graph represents the treatment effect within one animal; GAPDH and Na⁺/K⁺-ATPase subunit α -1 were used as reference genes. The mean fold change is calculated compared with c9t11 treatment (N = 6). $P < 0.05$ was considered significant (multilevel regression analysis).

reduction of SCDI-18 after TVA was disguised by the reduced amount of C18:0.

Still, we cannot definitely determine whether TVA itself was able to directly manipulate SCD or whether this was due to the c9t11 formed endogenously from TVA, as shown in Figure 1. It has been shown in bovine mammary epithelial cells that TVA exposure initially increased *SCD* mRNA expression (Jin et al., 2012). However, later during TVA exposure, *SCD* mRNA expression was decreased, potentially due to the endogenously produced c9t11 (Jin et al., 2012). In our study, TVA treatment of REC lasted for 48 h, suggesting that we could not detect an initial effect of TVA exposure but instead detected the subsequent effect of the endogenously formed c9t11.

As outlined above, the downregulation of *SCD* mRNA expression and the accompanying changes in SCDI-16 and SCDI-18 support the suggestion that activity of SCD is decreased by exposure of the cells to c9t11, t10c12, LA, OA, and TVA. However, the conclusions derived from the indices or from the amounts of FA in general must be drawn carefully. We cannot exclude influences other than endogenous production of FA. The amount of FA in the cells may also have been influenced by release of FA out of the cells. Measurement of SCD activity should be the subject of further investigation to clarify the de facto regulation mechanism of SCD in REC. Nevertheless, similar to findings in human aortic smooth muscle cells (Minville-Walz et al., 2012), porcine subcutaneous adipose tissue (Smith et al., 2002), mouse liver (Lee et al., 1998), and H2.35 liver cells (Choi et al., 2000), our study shows that CLA, as well as other FA including LA, OA, and TVA, may have a depressive effect on SCD in REC at least on mRNA level if applied for a longer time.

Regarding the supposed functional consequences of altered SCD activity, the enzyme is known to play a direct role in regulating lipid and energy metabolism of the cell (Flowers and Ntambi, 2008) as well as an indirect role on inflammation and stress (Liu et al., 2011) due to its control of MUFA production, in particular, C16:1n-7 *cis*-9 and OA. Apart from being a component of lipids, MUFA serve as mediators of signal transduction and cell differentiation (Miyazaki and Ntambi, 2003; Igal, 2010). In this way, CLA may indirectly modulate the morphology of rumen epithelium if applied for a longer amount of time.

Changes in *MCT1* and *MCT4* mRNA Expression

As shown in Figure 2, the upregulating effects on the mRNA expression of *MCT1* and (partially) *MCT4* expression were not specific for CLA but could have been caused, at least partially, by their precursors.

Monocarboxylate transporter 1 is of prominent interest because of its role as a transport protein involved in the handling of short-chain FA, of their metabolites, such as β -hydroxybutyrate, acetoacetate, and lactate, and in the pH homeostasis of the cell (Gäbel et al., 2002; Müller et al., 2002). Thus, any CLA-induced changes of MCT1 activity might influence, directly and indirectly, the transfer of metabolites. The role of MCT4 is still under discussion (Kirat et al., 2007; Dengler et al., 2015).

Role of PPAR α and PPAR γ

We focused on PPAR α - and PPAR γ -dependent pathways because CLA are known to interfere with these transcription factors (Moya-Camarena et al., 1999; Benjamin et al., 2013). The c9t11-induced upregulation of *MCT1* mRNA expression (Figures 2 and 4) could be suspended by both the PPAR α and PPAR γ antagonists. Similar to Benesch et al. (2014), we thus demonstrated that *MCT1* mRNA expression is upregulated by PPAR α . However, PPAR γ seems to act similarly on *MCT1* in REC.

We showed that antagonizing PPAR α enhanced the stimulating effect of c9t11 on *MCT4* (Figure 4). Thus, the addition of the PPAR α antagonist seems to have revealed a suppressing effect of PPAR α triggered by c9t11. Consequently, c9t11 action in REC probably includes both a PPAR α -dependent suppressing effect on *MCT4* mRNA expression as well as an upregulating effect initiated by other regulatory pathways. It is known that *MCT4* is upregulated by hypoxia-inducible factor (HIF) 1 α (Ullah et al., 2006; Rosafio and Pellerin, 2014). According to Yamasaki et al. (2012) and Zhang and Li (2012), HIF 1 α may also be activated by CLA and is therefore a possible pathway for the CLA-induced upregulation of *MCT4*. Although tissue and species differences within the regulation of *MCT* mRNA may be assumed (Cheng et al., 2012; Thomas et al., 2012), our data may give further hints on the regulation pathways of *MCT* triggered by CLA. Regarding *SCD*, application of the PPAR α and PPAR γ antagonist enhanced the c9t11-induced decrease of *SCD* mRNA expression. Thus, similar to the action of c9t11 on *MCT4* mRNA expression, the action of c9t11 on *SCD* included both an upregulating and downregulating component. In contrast to c9t11 action on *MCT4* mRNA expression, however, the upregulating, and not the downregulating, component seems to be mediated by PPAR α and PPAR γ . Therefore, we can conclude that PPAR α and PPAR γ mediate the upregulation of *SCD* mRNA expression in REC. However, the observed downregulation of *SCD* mRNA expression after c9t11 treatment (Figures 2 and 4) indicates that pathways

other than PPAR α and PPAR γ are simultaneously activated by CLA.

Considerations of CLA Availability in the Rumen

The described metabolic effects of CLA and of structurally similar FA observed have to be seen in the context of their use as feed additives. Taking into account the low duodenal availability of rumen-protected CLA after oral uptake (Pappritz et al., 2011), we have to assume that the rumen epithelium may be exposed to high amounts of CLA and TVA under certain feeding conditions.

Unfortunately, measurements of free CLA in the rumen fluid after CLA administration are not available. However, the amount of CLA accruing in the rumen per day after oral administration of CLA can be roughly calculated from the feeding instructions (e.g., Lutrell Combi, BASF SE, Ludwigshafen, Germany). Assuming a CLA administration of 125 g/d fed in 2 rations including 10% c9t11 and t10c12 (e.g., Lutrell Combi), a protection rate against biohydrogenation (depending on protection method) of up to 40% according to Pappritz et al. (2011), and a rumen fluid volume of 100 L according to Owens and Goetsch (1988), the initial concentration of CLA in the ruminal liquid may increase to 37.5 mg/L (133.9 μ M) of an isomer after feeding. Thus, compared with the initial concentrations of 0 to 0.8 mg/L of CLA in the rumen content of cows fed CLA-free diets (Troegeler-Mcynadier et al., 2006), diets supplemented with 125 g of CLA per day in 2 rations of 75 g each may result in approximately 50-fold-higher concentrations of CLA isomers in the rumen per feeding, and thus reach the range of CLA concentrations used in our experiments (100 and 200 μ M).

CONCLUSIONS

Our study, as well as previous studies, showed that 50 to 150 μ M FA supplemented to the culture medium is sufficient to induce remarkable changes concerning the functionality of cells. Additionally, we showed that the absorbed CLA act as signaling molecules and may influence various signaling pathways. However, structurally similar FA were able to induce comparable changes, indicating that various FA, not only CLA, may influence the function of REC when ingested. Furthermore, whether the alterations of epithelial function induced by CLA and structurally similar FA are detrimental to, beneficial to, or do not affect the whole animal cannot be determined at present and must be the subject of future investigations.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully appreciate Dirk K. Wissenbach (Department of Metabolomics, Helmholtz-Centre for Environmental Research Leipzig, Germany) for the assistance in GC-MS analysis. Special thanks to Gabriele Dobeleit (Institute of Physiological Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Germany) for her excellent technical assistance in performing and analyzing the GC data and Ines Urbansky (Institute of Veterinary Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Germany) for her excellent technical assistance at cell culture and PCR. This work was supported by the H. Wilhelm Schaumann Stiftung (Hamburg, Germany).

REFERENCES

- Agatha, G., A. Voigt, E. Kauf, and F. Zintl. 2004. Conjugated linoleic acid modulation of cell membrane in leukemia cells. *Cancer Lett.* 209:87–103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2003.11.022>.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389–3402. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Bates, D., M. Maechler, and B. Bolker. 2012. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and R syntax (version 0.999999-0). Accessed Oct. 8, 2015. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Bauman, D. E., J. W. Perfield 2nd, K. J. Harvatine, and L. H. Baumgard. 2008. Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: Lactation and the ruminant model. *J. Nutr.* 138:403–409.
- Benesch, F., F. Dengler, F. Masur, H. Pfannkuche, and G. Gäbel. 2014. Monocarboxylate transporters 1 and 4: Expression and regulation by PPAR α in ovine ruminal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307:R1428–R1437. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00408.2013>.
- Benjamin, S., S. Flotho, T. Borchers, and F. Spener. 2013. Conjugated linoleic acid isomers and their precursor fatty acids regulate peroxisome proliferator-activated receptor subtypes and major peroxisome proliferator responsive element-bearing target genes in HepG2 cell model. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 14:115–123. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.B1200175>.
- Benjamin, S., T. Hanhoff, T. Borchers, and F. Spener. 2005. An improved molecular test system for the screening of human PPAR transactivation by conjugated linoleic acid isomers and their precursor fatty acids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107:706–715. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200401041>.
- Bhattacharya, A., J. Banu, M. Rahman, J. Causey, and G. Fernandes. 2006. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J. Nutr. Biochem.* 17:789–810. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.02.009>.
- Cedernaes, J., J. Alsö, A. Västemark, U. Riscus, and H. B. Schiöth. 2013. Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase 1 index is increased and linoleic acid is decreased in obesity-prone rats fed a high-fat diet. *Lipids Health Dis.* 12:2. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-511X-12-2>.
- Cheng, C., N. F. Edin, K. H. Lauritzen, I. Aspödal, S. Christoffersen, L. Jian, L. J. Rasmussen, E. O. Pettersen, G. Xiaoqun, and L. H. Bergersen. 2012. Alterations of monocarboxylate transporter densities during hypoxia in brain and breast tumour cells. *Cell Oncol. (Dordr.)* 35:217–227. <http://dx.doi.org/10.1007/s13402-012-0081-9>.
- Chin, S. F., W. Liu, J. M. Storkson, Y. L. Ha, and M. W. Pariza. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a

- newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Compos. Anal.* 5:185–197. [http://dx.doi.org/10.1016/0889-1575\(92\)90037-K](http://dx.doi.org/10.1016/0889-1575(92)90037-K).
- Choi, Y., Y. C. Kim, Y. B. Han, Y. Park, M. W. Pariza, and J. M. Ntambi. 2000. The *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.* 130:1920–1924.
- Choi, Y., Y. Park, M. W. Pariza, and J. M. Ntambi. 2001. Regulation of stearoyl-CoA desaturase activity by the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid in HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284:689–693. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.5036>.
- Choi, Y., Y. Park, J. M. Storkson, M. W. Pariza, and J. M. Ntambi. 2002. Inhibition of stearoyl-CoA desaturase activity by the *cis*-9, *trans*-11 isomer and the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294:785–790. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00554-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00554-5).
- Corl, B. A., L. H. Baumgard, D. A. Dwyer, J. M. Griinari, B. S. Phillips, and D. E. Bauman. 2001. The role of delta(9)-desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11 CLA. *J. Nutr. Biochem.* 12:622–630.
- Dengler, F., R. Rackwitz, F. Benesch, H. Pfannkuche, and G. Gäbel. 2014. Bicarbonate-dependent transport of acetate and butyrate across the basolateral membrane of sheep rumen epithelium. *Acta Physiol. (Oxf.)* 210:403–414. <http://dx.doi.org/10.1111/apha.12155>.
- Dengler, F., R. Rackwitz, F. Benesch, H. Pfannkuche, and G. Gäbel. 2015. Both butyrate incubation and hypoxia upregulate genes involved in the ruminal transport of SCFA and their metabolites. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 99:379–390. <http://dx.doi.org/10.1111/jpn.12201>.
- Eder, K., and R. Ringseis. 2010. Metabolism and actions of conjugated linoleic acids on atherosclerosis-related events in vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 54:17–36. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200900042>.
- Flowers, M. T., and J. M. Ntambi. 2008. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 19:248–256. <http://dx.doi.org/10.1097/MOL.0b013e3282f9b54d>.
- Gäbel, G., J. R. Aschenbach, and F. Müller. 2002. Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: Implications and limitations. *Anim. Health Res. Rev.* 3:15–30. <http://dx.doi.org/10.1079/AHRR200237>.
- Gálfi, P., S. Neogrady, and F. Kutas. 1981. Culture of epithelial cells from bovine ruminal mucosa. *Vet. Res. Commun.* 4:295–300.
- Graham, C., I. Gatherer, I. Haslam, M. Glanville, and N. L. Simmons. 2007. Expression and localization of monocarboxylate transporters and sodium/proton exchangers in bovine rumen epithelium. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292:R997–R1007. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00343.2006>.
- Griinari, J. M., B. A. Corl, S. A. Corl, S. H. Lacy, P. Y. Chouinard, K. V. Nurmela, and D. E. Bauman. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by delta(9)-desaturase. *J. Nutr.* 130:2285–2291.
- Harfoot, C. G., and G. P. Hazlewood. 1997. Lipid metabolism in the rumen. Pages 382–426 in *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson and C. S. Stewart, ed. Chapman & Hall, London, UK.
- Hox, J. J. 2010. *Multilevel Analysis: Techniques and Applications*. 2nd ed. Routledge, New York, NY.
- Igal, R. A. 2010. Stearoyl-CoA desaturase-1: A novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis* 31:1509–1515. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgq131>.
- Jin, Y. C., Z. H. Li, Z. S. Hong, C. X. Xu, J. A. Han, S. H. Choi, J. L. Yin, Q. K. Zhang, K. B. Lee, S. K. Kang, M. K. Song, Y. J. Kim, H. S. Kang, Y. J. Choi, and H. G. Lee. 2012. Conjugated linoleic acid synthesis-related protein proteasome subunit alpha 5 (PSMA5) is increased by vaccenic acid treatment in goat mammary tissue. *J. Dairy Sci.* 95:4286–4297. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4281>.
- Kadegowda, A. K. G., M. Bionaz, L. S. Piperova, R. A. Erdman, and J. J. Loo. 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. *J. Dairy Sci.* 92:4276–4289. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1932>.
- Kadegowda, A. K. G., T. A. Burns, M. C. Miller, and S. K. Duckett. 2013. *Cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid is endogenously synthesized from palmitelaidic (C16:1 *trans*-9) acid in bovine adipocytes. *J. Anim. Sci.* 91:1614–1623. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2012-5590>.
- Kirat, D., Y. Matsuda, N. Yamashiki, H. Hayashi, and S. Kato. 2007. Expression, cellular localization, and functional role of monocarboxylate transporter 4 (MCT4) in the gastrointestinal tract of ruminants. *Gene* 391:140–149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2006.12.020>.
- Kitchen, R. R., M. Kubista, and A. Tichopad. 2010. Statistical aspects of quantitative real-time PCR experiment design. *Methods* 50:231–236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmeth.2010.01.025>.
- König, B., A. Koch, K. Giggel, B. Dordschbal, K. Eder, and G. I. Stangl. 2008. Monocarboxylate transporter (MCT)-1 is up-regulated by PPARalpha. *Biochim. Biophys. Acta* 1780:899–904. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.002>.
- Lee, K. N., M. W. Pariza, and J. M. Ntambi. 1998. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearoyl-CoA desaturase mRNA expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248:817–821. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1998.8994>.
- Leesnitzer, L. M., D. J. Parks, R. K. Bledsoe, J. E. Cobb, J. L. Collins, T. G. Consler, R. G. Davis, E. A. Hull-Ryde, J. M. Lenhard, L. Patel, K. D. Plunket, J. L. Shenk, J. B. Stimmel, C. Therapontos, T. M. Willson, and S. G. Blanchard. 2002. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry* 41:6640–6650. <http://dx.doi.org/10.1021/bi0159581>.
- Leonard, A. E., S. L. Pereira, H. Sprecher, and Y.-S. Huang. 2004. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 43:36–54. [http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00040-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00040-7).
- Liu, X., M. S. Strable, and J. M. Ntambi. 2011. Stearoyl CoA desaturase 1: Role in cellular inflammation and stress. *Adv. Nutr.* 2:15–22. <http://dx.doi.org/10.3945/an.110.000125>.
- Minville-Walz, M., J. Gresti, L. Pichon, S. Bellenger, J. Bellenger, M. Narce, and M. Rialland. 2012. Distinct regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression by *cis* and *trans* C18:1 fatty acids in human aortic smooth muscle cells. *Genes Nutr.* 7:209–216. <http://dx.doi.org/10.1007/s12263-011-0258-2>.
- Miyazaki, M., and J. M. Ntambi. 2003. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 68:113–121. [http://dx.doi.org/10.1016/S0952-3278\(02\)00261-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0952-3278(02)00261-2).
- Mosley, E. E., M. K. McGuire, J. E. Williams, and M. A. McGuire. 2006. *Cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid is synthesized from vaccenic acid in lactating women. *J. Nutr.* 136:2297–2301.
- Moya-Camarena, S. Y., J. P. Vanden Heuvel, S. G. Blanchard, L. A. Leesnitzer, and M. A. Belury. 1999. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPARalpha. *J. Lipid Res.* 40:1426–1433.
- Müller, A., R. Ringseis, K. Düsterloh, S. Gahler, K. Eder, and H. Steinhart. 2005. Detection of conjugated dienoic fatty acids in human vascular smooth muscle cells treated with conjugated linoleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1737:145–151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.09.011>.
- Müller, F., J. R. Aschenbach, and G. Gäbel. 2000. Role of Na⁺/H⁺ exchange and HCO₃⁻ transport in pH_i recovery from intracellular acid load in cultured epithelial cells of sheep rumen. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 170:337–343.
- Müller, F., K. Huber, H. Pfannkuche, J. R. Aschenbach, G. Breves, and G. Gäbel. 2002. Transport of ketone bodies and lactate in the sheep ruminal epithelium by monocarboxylate transporter 1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283:G1139–G1146. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00268.2001>.
- Murphy, E. F., G. J. Hooiveld, M. Müller, R. A. Calogero, and K. D. Cashman. 2007. Conjugated linoleic acid alters global gene expression in human intestinal-like Caco-2 cells in an isomer-specific manner. *J. Nutr.* 137:2359–2365.

- Odens, L. J., R. Burgos, M. Innocenti, M. J. VanBaale, and L. H. Baumgard. 2007. Effects of varying doses of supplemental conjugated linoleic acid on production and energetic variables during the transition period. *J. Dairy Sci.* 90:293–305. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72630-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72630-9).
- Owens, F. N., and A. L. Goetsch. 1988. Ruminant Fermentation. Pages 145–171 in *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*. D. C. Church, ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Pappritz, J., P. Lebzien, U. Meyer, G. Jahreis, R. Kramer, G. Flachowsky, and S. Dänicke. 2011. Duodenal availability of conjugated linoleic acids after supplementation to dairy cow diets. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113:1443–1455. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201100170>.
- Park, Y., J. M. Storkson, K. J. Albright, W. Liu, and M. W. Pariza. 2005. Biological activities of conjugated fatty acids: Conjugated eicosadienoic (conj. 20:2delta (c11,t13/t12,c14)), eicosatrienoic (conj. 20:3delta (c8,t12,c14)), and heneicosadienoic (conj. 21:2delta (c12,t14/c13,t15)) acids and other metabolites of conjugated linoleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1687:120–129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.11.010>.
- Parodi, P. W. 1997. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J. Nutr.* 127:1055–1060.
- Peter, A., A. Cegan, S. Wagner, R. Lehmann, N. Stefan, A. Königsrainer, I. Königsrainer, H.-U. Häring, and E. Schleicher. 2009. Hepatic lipid composition and stearoyl-coenzyme A desaturase 1 mRNA expression can be estimated from plasma VLDL fatty acid ratios. *Clin. Chem.* 55:2113–2120. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2009.127274>.
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, and L. Dempfle. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30:e36. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>.
- Reynolds, C. M., C. E. Loscher, A. P. Moloney, and H. M. Roche. 2008. *Cis-9, trans-11*-conjugated linoleic acid but not its precursor *trans*-vaccenic acid attenuate inflammatory markers in the human colonic epithelial cell line Caco-2. *Br. J. Nutr.* 100:13–17. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114508894329>.
- Ringseis, R., A. Müller, K. Düsterloh, S. Schleser, K. Eder, and H. Steinhart. 2006. Formation of conjugated linoleic acid metabolites in human vascular endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1761:377–383. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.02.005>.
- Roche, H. M., A. M. Terres, I. B. Black, M. J. Gibney, and D. Kelleher. 2001. Fatty acids and epithelial permeability: effect of conjugated linoleic acid in Caco-2 cells. *Gut* 48:797–802. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.48.6.797>.
- Rosafio, K., and L. Pellerin. 2014. Oxygen tension controls the expression of the monocarboxylate transporter MCT4 in cultured mouse cortical astrocytes via a hypoxia-inducible factor-1 α -mediated transcriptional regulation. *Glia* 62:477–490. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.22618>.
- Salas-Salvado, J., F. Marquez-Sandoval, and M. Bullo. 2006. Conjugated linoleic acid intake in humans: A systematic review focusing on its effect on body composition, glucose, and lipid metabolism. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46:479–488. <http://dx.doi.org/10.1080/10408390600723953>.
- Seidel, A., T. Gück, and H. Fuhrmann. 2005. The influence of long-chain polyunsaturated fatty acids on total lipid fatty acid composition of a canine mastocytoma cell line. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 52:219–224. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0442.2005.00711.x>.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Gocke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76–85. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- Smith, S. B., T. S. Hively, G. M. Cortese, J. J. Han, K. Y. Chung, P. Castenada, C. D. Gilbert, V. L. Adams, and H. J. Mersmann. 2002. Conjugated linoleic acid depresses the delta9 desaturase index and stearoyl coenzyme A desaturase enzyme activity in porcine subcutaneous adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 80:2110–2115.
- Sönnichsen, M., and B. W. Müller. 1999. A rapid and quantitative method for total fatty acid analysis of fungi and other biological samples. *Lipids* 34:1347–1349.
- Thomas, C., D. J. Bishop, K. Lambert, J. Mercier, and G. A. Brooks. 2012. Effects of acute and chronic exercise on sarcolemmal MCT1 and MCT4 contents in human skeletal muscles: Current status. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 302:R1–R14. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00250.2011>.
- Troegeler-Meynadier, A., L. Bret-Bennis, and F. Enjalbert. 2006. Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reprod. Nutr. Dev.* 46:713–724. <http://dx.doi.org/10.1051/rnd:2006046>.
- Ullah, M. S., A. J. Davies, and A. P. Halestrap. 2006. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 281:9030–9037. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M511397200>.
- Wang, Y., D. Botolin, J. Xu, B. Christian, E. Mitchell, B. Jayaprakasam, M. G. Nair, J. M. Peters, J. V. Busik, L. K. Olson, and D. B. Jump. 2006. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J. Lipid Res.* 47:2028–2041. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M600177-JLR200>.
- Xu, H. E., T. B. Stanley, V. G. Montana, M. H. Lambert, B. G. Shearer, J. E. Cobb, D. D. McKee, C. M. Galardi, K. D. Plunket, R. T. Nolte, D. J. Parks, J. T. Moore, S. A. Klierer, T. M. Willson, and J. B. Stimmel. 2002. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR α . *Nature* 415:813–817. <http://dx.doi.org/10.1038/415813a>.
- Yamasaki, M., T. Nagatomo, T. Matsuyama, Y. Ikeho, E. Kato, K. Nishiyama, Y. Sakakibara, M. Suiko, and K. Nishiyama. 2012. Conjugated linoleic acids inhibit hypoxia inducible factor-1 α stabilization under hypoxic condition in human hepatocellular carcinoma cells. *J. Oleo Sci.* 61:491–496. <http://dx.doi.org/10.5650/jos.61.491>.
- Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, and T. L. Madden. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.
- Zhang, J., and D. Li. 2012. Effect of conjugated linoleic acid on inhibition of prolyl hydroxylase 1 in hearts of mice. *Lipids Health Dis.* 11:22. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-511X-11-22>.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental Results and Discussion

The file contains additional results of the gas chromatography analysis with a short discussion of these results.

There are fatty acids (FA) we could not identify. They are named “Unknown 1-3” and the amounts of these FA are listed in Tables 1-3.

Unknown 1 (Tables 1-3) elutes between C14:0 and C14:2n-6 *trans*-6, *cis*-8. We observed a tendency for it to decrease after all treatments, but it was strongest for that of *trans*-vaccenic acid (TVA) at 200 μ M, where the decrease of Unknown 1 was significantly decreased relative to the control ($P < 0.026$; Table 3).

Unknown 2 coelutes with C16:2n-7 *cis*-7, *trans*-9. C16:2n-7 *cis*-7, *trans*-9 was identified because of its elution time and its increase after conjugated linoleic acid (CLA) c9t11 treatment being significantly different from that of the control at 200 μ M ($P < 0.0125$; Table 1). Nevertheless, the amount of this peak decreased after CLA t10c12 (Table 1), linoleic (LA) and oleic acid (OA) (Table 2) supplementation from approximately 20 nmol/mg total protein to 10 nmol/mg total protein after t10c12 treatment and to 15 nmol/mg protein after LA and OA treatment, which leads to the assumption that C16:2n-7 *cis*-7, *trans*-9 coelutes with an unknown FA (Unknown 2). For TVA treatment, no difference was observed, justifying this assumption (Table 3). C16:2n-7 *cis*-7, *trans*-9 is the metabolite of c9t11 built by stearoyl-CoA desaturase after TVA supplementation, counteracting the decrease of Unknown 2.

Unknown 3 coelutes with C16:2n-7 *cis*-6, *trans*-9. C16:2n-7 *cis*-6, *trans*-9 was identified because of its elution time and its increase after TVA treatment being significantly different from that of the control for 100 and 200 μ M ($P < 0.009$; Table 3). Nevertheless, the amount of this peak tended to decrease after CLA treatment ($P < 0.009$; Table 1) from approximately 6 nmol/mg total protein to approximately 4.5 nmol/mg total protein after c9t11 or t10c12

J. Dairy Sci. 99:3081–3095
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10042>
 © American Dairy Science Association®, 2016.

treatment, which leads to the assumption that C16:2n-7, c6t9 coelutes with an unknown FA (Unknown 3).

As these unknown FA were characterized by a significant decrease after the appropriate treatment, we assumed that they are not direct metabolites of the administered FA. Further clues on the identity of these FA may be assessed by different analytical methods, which may counteract the problem of coelution within the Omegawax 320 GC capillary column.

J. Dairy Sci. 99:3081–3095
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10042>
 © American Dairy Science Association®, 2016.

Supplemental Table S1. Primers used for RT-qPCR

| Gene | GenBank accession no. | Forward and Reverse Primer | E ¹ | T _a ² | AL ³ |
|--|-----------------------|--|----------------|-----------------------------|-----------------|
| <i>MCT1</i> | XM_004002335 | 5'-TGTTGGAGTCATTGGAGGTCTTG-3' 5'-TTTGCCAGCGGTCGTCTCTT-3' | 90.5 | 60°C | 96 bp |
| <i>MCT4</i> | NM_001109980 | 5'-ACAGGGGTCCTTACTGGCTTG-3' 5'-CGCTTGTTGAAGTAGCGGTTGA-3' | 95.6 | 60°C | 80 bp |
| <i>ACO</i> | XM_004013491 | 5'-AAGTCCATCCAAGCTGTCCT-3' 5'-TGCTCCCCTGAAGAAAATCC-3' | 95.9 | 57°C | 91 bp |
| <i>SCD</i> | NM_001009254 | 5'-CCCAGCTGTCAGAGAAAAGG-3' 5'-GATGAAGCACAAACAGCAGGA-3' | 95.8 | 56°C | 115 bp |
| <i>GAPDH</i> | NM_001190390 | 5'-CCACGGCACAGTCAAGGCAGAGAA-3' 5'-TCAGCACCAGCATCACCCTTCTTG-3' | 84.0 | 67°C | 111 bp |
| <i>Na⁺/K⁺-ATPase alpha-1</i> | NM_001009360 | 5'-GAGCTGGGTGGCCTGGGAGAAC-3' 5'-CATCGTCGGTGTCAAACCTGGAAGC-3' | 89.0 | 67°C | 97 bp |

¹Primer pair efficiency (E, in %) was determined using the relative expression software tool (REST2009; (Pfaffl et al., 2002)).

²Annealing temperature (T_a).

³Amplicon length (AL)

J. Dairy Sci. 99:3081–3095

<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10042>

© American Dairy Science Association®, 2016.

Supplemental Table S2. Additionally reported fatty acids of cultured ruminal epithelial cells (Median [Q25, Q75])

| Fatty acid (nmol/mg total protein) | Medium supplementation ¹ | | | | | <i>P</i> -value ² |
|--|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|
| | c9t11 CLA | | | t10c12 CLA | | |
| | Control | 100 μ M | 200 μ M | 100 μ M | 200 μ M | |
| 18:3n-6 | 0.47 [0.32, 0.79] | 0.38 [0.26, 0.56] | 0.32 [0.13, 0.47] | 0.41 [0.35, 0.51] | 0.33 [0.32, 0.68] | 0.734 |
| 18:3n-3 | 0.83 [0.63, 1.03] | 0.65 [0.63, 0.73] | 0.68 [0.59, 0.74] | 0.82 [0.64, 1.08] | 0.67 [0.58, 1.15] | 0.627 |
| 20:2n-6 | 0.89 [0.59, 1.14] | 0.64 [0.53, 1.11] | 0.48 [0.39, 0.65] | 0.62 [0.49, 1.07] | 0.69 [0.60, 0.92] | 0.249 |
| 20:4n-6 | 13.5 [10.6, 16.8] | 8.78 [8.71, 11.0] | 9.33 [7.83, 11.2] | 9.72 [9.09, 13.9] | 8.90 [8.36, 13.4] | 0.105 |
| 20:5n-3 | 2.11 [1.92, 3.65] | 2.67 [2.24, 2.77] | 2.04 [1.80, 2.92] | 2.15 [2.15, 2.67] | 1.81 [1.33, 2.31] | 0.304 |
| 22:5n-3 | 7.65 [5.57, 9.90] | 5.34 [4.54, 6.34] | 5.41 [4.13, 6.55] | 6.50 [5.21, 8.98] | 5.94 [5.10, 8.94] | 0.324 |
| 22:6n-3 | 7.41 [5.45, 10.1] | 5.07 [4.10, 6.00] | 5.04 [3.78, 6.35] | 5.43 [4.44, 7.79] | 4.78 [4.18, 8.00] | 0.431 |

¹Medium of cultured ruminal epithelial cells was supplemented with either 100 or 200 μ M of CLA c9t11 or CLA t10c12.²Kruskal-Wallis test was performed to identify differences between the medians of the differently supplemented groups (N = 5). $P < 0.05$ was considered to be significant.

J. Dairy Sci. 99:3081–3095

<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10042>

© American Dairy Science Association®, 2016.

Supplemental Table S3. Additionally reported fatty acids of cultured ruminal epithelial cells (Median [Q25, Q75])

| Fatty acid [nmol/mg total protein] | Medium supplementation ¹ | | | P-value ² |
|--|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------|----------------------|
| | Control | LA | OA | |
| | | 100 μ M | 100 μ M | |
| 18:3n-6 | 0.56 [0.47, 0.86] | 0.93 [0.86, 1.20] | 0.66 [0.48, 0.71] | 0.018 |
| 18:3n-3 | 1.13 [0.85, 2.34] | 0.81 [0.53, 0.95] | 0.78 [0.70, 1.43] | 0.185 |
| 20:2n-6 | 0.96 [0.74, 1.66] | 48.8 [30.3, 68.1]* ³ | 1.40 [1.02, 1.86] | 0.007 |
| 20:4n-6 | 16.5 [12.5, 21.1] | 11.5 [10.0, 13.9] | 13.5 [12.3, 17.1] | 0.101 |
| 20:5n-3 | 3.21 [1.87, 6.38] | 1.54 [1.01, 2.81] | 2.46 [1.97, 5.01] | 0.185 |
| 22:5n-3 | 10.1 [7.63, 12.8] | 10.8 [8.35, 12.8] | 8.45 [8.16, 12.6] | 0.914 |
| 22:6n-3 | 9.20 [7.46, 10.7] | 6.24 [3.97, 6.84] | 7.06 [6.26, 7.64] | 0.065 |

¹Medium of cultured ruminal epithelial cells was supplemented with 100 μ M of linoleic acid (LA) or oleic acid (OA).²Kruskal-Wallis test was performed to identify differences between the medians of the differently supplemented groups (N = 5). $P < 0.05$ was considered to be significant.³Mann-Whitney U test with Bonferroni correction was performed to identify the potential differences between the supplemented groups and the control group when the Kruskal-Wallis test indicated significant differences.* $P < 0.025$ was considered to be significant.

J. Dairy Sci. 99:3081–3095

<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10042>

© American Dairy Science Association®, 2016.

Supplemental Table S4. Additionally reported fatty acids of cultured ruminal epithelial cells (Median [Q25, Q75])

| Fatty acid [nmol/mg total protein] | Medium supplementation ¹ | | | <i>P</i> -value ² |
|--|-------------------------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|
| | Control | TVA | | |
| | | 100 μ <i>M</i> | 200 μ <i>M</i> | |
| 18:3n-6 | 0.51 [0.39, 0.57] | 0.54 [0.26, 0.68] | 0.35 [0.26, 0.58] | 0.454 |
| 18:3n-3 | 1.03 [0.77, 1.23] | 1.16 [0.99, 1.74] | 1.07 [1.01, 1.28] | 0.330 |
| 20:2n-6 | 1.02 [0.68, 1.22] | 0.65 [0.58, 1.91] | 0.59 [0.52, 1.03] | 0.275 |
| 20:4n-6 | 16.5 [13.4, 17.8] | 13.8 [13.2, 25.6] | 14.3 [13.0, 17.7] | 0.827 |
| 20:5n-3 | 2.37 [1.83, 3.08] | 3.25 [2.40, 4.41] | 2.85 [2.64, 3.20] | 0.395 |
| 22:5n-3 | 9.53 [7.55, 10.3] | 8.18 [7.84, 15.6] | 8.26 [7.58, 11.0] | 0.878 |
| 22:6n-3 | 9.20 [7.35, 10.5] | 8.58 [7.33, 14.7] | 8.01 [7.78, 10.2] | 0.914 |

¹Medium of cultured ruminal epithelial cells was supplemented with 100 or 200 μ M of *trans*-vaccenic acid (TVA).²Kruskal-Wallis test was performed to identify differences between the medians of the differently supplemented groups (N = 5). $P < 0.05$ was considered to be significant.

4 Ergänzung zur Originalarbeit

4.1 Nachweis von *SCD*-mRNA im nativen Pansenepithel des Schafes

Wie bereits in der aufgeführten Originalarbeit erwähnt, konnte in den primärkultivierten Pansenepithelzellen der Nachweis von *SCD*-mRNA erbracht werden. Darüber hinaus wurde versucht, einen Nachweis der *SCD* auf mRNA-Ebene im nativen Pansenepithel vom Schaf zu erbringen. Es wurde das Epithel der beiden Hauptbereiche des Pansens (Vorhof und ventraler Pansensack) analysiert. Die Ergebnisse der Nachweise sind in Abbildung 4 dargestellt. Sowohl im Vorhof des Pansens als auch im ventralen Pansensack konnte *SCD*-mRNA nachgewiesen werden. Zur Absicherung unseres Ergebnisses wurde eine noRT-Kontrolle mitgeführt, um Verunreinigungen mit genomischer DNA auszuschließen. Hierzu wird, parallel zu den Proben, der Reaktionsansatz ohne reverse Transkriptase inkubiert und aufgetragen. Die Präsenz eines Amplifikats in der noRT-Kontrolle würde eine Verunreinigung mit DNA aufzeigen.

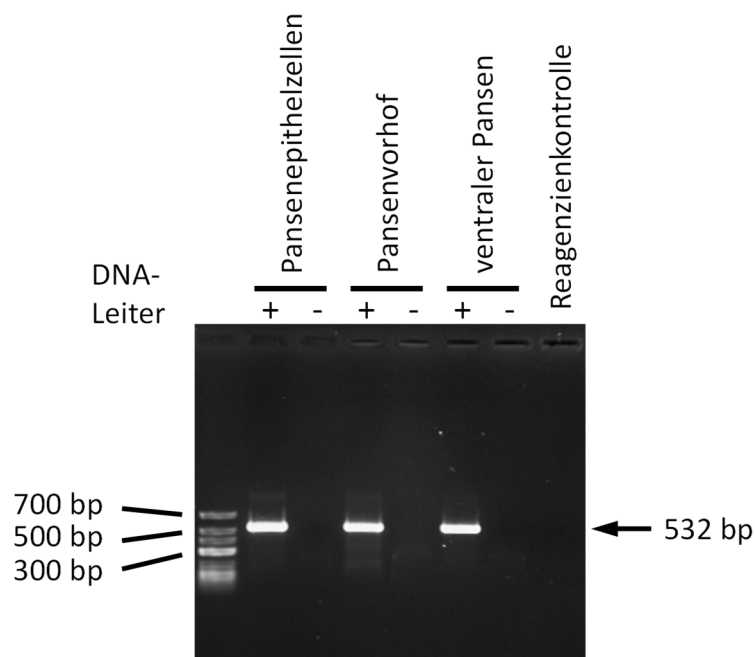


Abbildung 4. mRNA-Nachweis der *SCD* (532 bp) in kultivierten Pansenepithelzellen, Pansenvorhof und ventralem Pansensack des Schafes (DNA-Leiter = GeneRuler™ Low Range, Fermentas; + = RT-PCR; - = noRT Kontrolle; Erläuterungen im Text)

Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. med.

Titel: ***In vitro*-Untersuchungen zum Einfluss von konjugierten Linolsäuren auf kultivierte Pansenepithelzellen vom Schaf als direkt exponiertes Gewebe bei oraler Supplementierung**

eingereicht von: Franziska Masur

angefertigt am: Rudolf-Schönheimer-Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät Leipzig

Veterinär-Physiologischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig

Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig

betreut von: Prof. Dr. med. Torsten Schöneberg
Prof. Dr. med. vet. Gotthold Gäbel
Prof. Dr. med. vet. Herbert Fuhrmann

April 2017

Die Behandlung der primärkultivierten Pansenepithelzellen (PEZ) mit konjugierten Linolsäuren (CLA) und strukturverwandten Fettsäuren wie der Linolsäure (LA), der Ölsäure (OA) und der *trans*-Vaccensäure (TVA) hat gezeigt, dass diese Fettsäuren, speziell die CLAs, Einfluss auf die PEZ nehmen können.

Untersucht wurden die behandelten PEZ im Hinblick auf Veränderungen im Fettsäuremuster sowie in der mRNA-Expression von gezielt ausgewählten Strukturen nach 48-stündiger Exposition gegenüber CLA C18:2 *cis*-9, *trans*-11 (c9t11) und CLA C18:2 *trans*-10, *cis*-12 (t10c12), LA, OA und TVA.

1 Veränderungen im Fettsäuremuster der kultivierten Pansenepithelzellen

Veränderungen im Fettsäuremuster, sei es durch die Aufnahme und Metabolisierung der zugegebenen Fettsäuren selbst oder durch Einflussnahme dieser auf weitere Fettsäuren, können sich in vielfältiger Weise auf die Zelle auswirken.

1.1 Akkumulation und Metabolisierung der supplementierten Fettsäuren

Die Supplementierung des Kulturmediums der PEZ mit CLA c9t11 und t10c12 sowie strukturverwandten Fettsäuren schlug sich in der Zusammensetzung der später in den lysierten PEZ gefundenen Fettsäuren nieder. In dem Gesamtfettsäureextrakt ließen sich nicht nur die supplementierten Fettsäuren selbst in erhöhtem Maße in der jeweiligen Kultur nachweisen, sondern auch ihre Metaboliten. Dabei konnten vorwiegend Produkte der β -Oxidation (C16:1 und C16:2) sowie Elongationsprodukte (C20:1 und C20:2, C22:1 und C22:2) detektiert werden. Dies wurde bei Exposition der PEZ gegenüber den *cis*-Fettsäuren (OA und LA) und ebenso den *trans*-Fettsäuren (TVA, CLA c9t11 und t10c12) festgestellt. Desaturasen scheinen bei der Metabolisierung in den PEZ ebenfalls eine Rolle zu spielen. In den TVA-behandelten Kulturen konnte die CLA c9t11 als Produkt der Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD) nachgewiesen werden. PEZ sind somit wie auch andere Gewebe in der Lage, endogen CLA c9t11 zu bilden.

1.2 Veränderungen im Gehalt von weiteren Fettsäuren

In den fettsäurebehandelten Zellen zeigten sich im Vergleich zu den Kontrollzellen geringere Mengen an Palmitoleinsäure (C16:1 *cis*-9) und OA (C18:1 *cis*-9), den Hauptprodukten der SCD. Die Edukte der SCD (C16:0 und C18:0) waren nicht verändert, außer unter TVA-Behandlung. Hier zeigte sich eine Verringerung des Gehalts an C18:0. Die Fettsäurebehandlungen hatten weiterhin keinen Einfluss auf andere geradzahlige gesättigte Fettsäuren (C14:0 bis C24:0). Bei den n-3- und den n-6-Fettsäuren konnten ebenfalls keine veränderten Gehalte festgestellt werden, sodass sich die Fettsäurebehandlungen fast ausschließlich auf die einfach ungesättigten Fettsäuren ausgewirkt haben.

2 Beeinflussung von CLA-Targets in den Pansenepithelzellen

2.1 Veränderungen der SCD-mRNA-Expression und des SCD-Index

In den PEZ konnte SCD-mRNA nachgewiesen werden. Ein indirekter Nachweis des kodierten Proteins wurde über die Detektion der endogenen Umwandlung der TVA in die c9t11 erbracht. Einflüsse der supplementierten Fettsäuren auf die SCD zeigten sich nach 48-stündiger Inkubation der PEZ. Nach CLA-, LA-, OA- oder TVA-Behandlung kam es zu einer signifikanten Herunterregulierung der SCD-mRNA-Expression. Die gemessenen Veränderungen im Fettsäuremuster in Bezug auf die C16:0, C18:0, C16:1 *cis*-9 und die C18:1 *cis*-9 legen die

Zusammenfassung

Vermutung nahe, dass sich die verminderte Expression der *SCD*-mRNA direkt in funktionellen Änderungen niederschlägt. Quantifiziert wurden die funktionellen Veränderungen durch die Berechnung der SCD-Indizes (SCDI-16 und SCDI-18). Diese setzen die Produkte (C16:1 *cis*-9 und C18:1 *cis*-9) ins Verhältnis zu ihren Edukten (C16:0 und C18:0). Im Falle der Inkubation mit den CLAs, der LA und der OA kam es - übereinstimmend mit den Veränderungen in der mRNA-Expression - zu einem signifikanten Absinken des SCDI-16 und des SCDI-18. Bei der Inkubation der PEZ mit TVA zeigten sich allerdings keine direkten Veränderungen in den genannten Indizes. Es konnte aber bei den TVA-inkubierten Zellen ein gesunkener Elongations-Index ($EI = C18:0/C16:0$) beobachtet werden, was wahrscheinlich auf eine verminderte Umwandlung der C16:0 in die C18:0 über die Elongase 6 zurück zu führen ist. Der daraus resultierende verminderte Gehalt an C18:0 führte vermutlich dazu, dass sich beim SCDI-18 keine Änderung zeigte, obwohl der Gehalt an C18:1 *cis*-9 stark vermindert war. Schlussfolgerungen bezüglich der Regulierung der SCD auf Gen- und Proteinebene können hieraus trotzdem nur mit Vorsicht gezogen werden. Die vergleichende Analyse der Literatur zu Effekten von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) und CLAs auf die SCD hat gezeigt, dass eine Änderung der mRNA-Expression nicht immer konsekutiv eine Änderung auf Proteinebene zur Folge hat oder diese zumindest nicht eindeutig durch die Berechnung von Indizes belegt werden kann. Vielmehr scheinen hier auch gewebe- und speziesspezifische Unterschiede bei den Auswirkungen auf die SCD-mRNA-Expression und das Protein selbst möglich, wie auch Moya-Camarena und Belury (1999) in ihrem Review zu bedenken geben. Da der Nachweis der SCD im Pansenepithel von Wiederkäuern zuvor nicht abschließend erbracht worden war, sollte auch der Nachweis im nativen Gewebe erfolgen. Wir konnten *SCD*-mRNA im Epithel des Pansenvorhofs und im ventralen Pansen des Schafes nachweisen, sodass als gesichert gelten kann, dass auch dieses Gewebe neben anderen (unter anderem laktierende Milchdrüse, Fettgewebe) in der Lage ist, CLAs endogen zu synthetisieren.

2.2 Beeinflussung der *MCT1*- und *MCT4*-mRNA-Expression

Der Nachweis der Monocarboxylattransporter (MCT)1 und MCT4 (mRNA und Protein) im Pansenepithel von Wiederkäuern respektive dem Schaf und in den kultivierten PEZ wurde bereits in früheren Studien erbracht (Müller et al., 2002; Benesch et al., 2014). In dieser Studie sollten nun direkte Änderungen in der Expression untersucht werden.

Beide CLA-Isomere steigerten die *MCT1*- und *MCT4*-mRNA-Expression nach einer 48-stündigen Inkubation signifikant. Zum Teil erfolgte diese Expressionssteigerung auch durch die strukturverwandten Fettsäuren. Durch ihre Rolle als Transportproteine sind die MCTs an der Aufnahme von kurzkettigen Fettsäuren und deren Metaboliten über das Pansenepithel sowie der Aufrechterhaltung der pH-Homöostase beteiligt – beides ist essentiell für den Wiederkäuer.

2.3 Die Rolle von PPAR α und PPAR γ bei der Regulation der *MCTs* und der *SCD*

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α und PPAR γ sind als Transkriptionsfaktoren bekannt, die mit CLAs und langkettigen Fettsäuren allgemein interagieren (Kliwer et al., 1997; Houseknecht et al., 1998; Moya-Camarena et al., 1999a; Moya-Camarena et al., 1999b; Brown et al., 2003). In Bezug auf die *SCD* und die *MCTs* scheinen PPAR α und PPAR γ in unterschiedlicher Art und Weise den Einfluss von CLA c9t11 zu vermitteln.

Die CLA c9t11-induzierte Hochregulierung der *MCT1*-mRNA konnte durch den spezifischen PPAR α - beziehungsweise PPAR γ -Antagonisten unterdrückt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass beide Transkriptionsfaktoren an der Regulation von *MCT1* durch CLA c9t11 in den kultivierten PEZ beteiligt sind.

Beim *MCT4* verstärkte der PPAR α -Antagonist den hochregulierenden Effekt von CLA c9t11, sodass zu vermuten ist, dass PPAR α hier einen hemmenden Einfluss auf die c9t11-induzierte *MCT4*-Hochregulierung ausübt. Der eigentliche Regulationsweg verläuft hier vermutlich über weitere Transkriptionsfaktoren. Entgegen der Arbeit von Benesch et al. (2014), die eine Unabhängigkeit der *MCT4*-Expression von der PPAR α -Aktivierung aufzeigte, scheint sich unter den in dieser Studie gewählten Bedingungen für den ruminalen *MCT4* doch eine gewisse PPAR-Abhängigkeit abzuzeichnen.

Die Untersuchungen zur Einflussnahme von c9t11, t10c12 und den strukturverwandten Fettsäuren auf die *SCD* in den PEZ und der Vergleich mit vorangegangenen Studien an anderen Geweben und Zellen zeigten, dass sich die Regulation der *SCD* vor allem hinsichtlich des ubiquitären Vorhandenseins von Fettsäuren sehr komplex darstellt. Die in dieser Arbeit erfolgten Versuche mit PPAR α - und PPAR γ -Antagonisten bestätigen weiter die Vielschichtigkeit der Regulation der *SCD* durch PUFAs, genauer der CLA c9t11. Sowohl der PPAR α - als auch der PPAR γ -Antagonist verstärkten die CLA c9t11-induzierte Herunterregulierung der mRNA. Dabei scheint die durch CLA c9t11-induzierte Herunterregulierung der *SCD*-mRNA zunächst im Widerspruch zur Hochregulierung der *SCD* durch PPAR-Agonisten (Miller und Ntambi, 1996) zu stehen, obgleich CLA c9t11 nachgewiesenermaßen PPAR-agonistische Eigenschaften hat (Benjamin et al., 2005). Montanaro et al. (2007) wiesen die in Abb. 5 dargestellten Interaktionen zwischen dem sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1), dem liver X receptor (LXR), dem retinoid X receptor (RXR) und dem PPAR α nach, womit sich die PPAR-agonistische Wirkung der CLA c9t11 erklären lässt, ohne dass es zu einer Hochregulierung der *SCD*-mRNA kommt. Der PPAR α - und PPAR γ -agonistische Effekt scheint sich hier modulatorisch, möglicherweise in Abhängigkeit von der Konzentration, auf die mRNA auszuwirken. Welche Konsequenzen sich durch den Einfluss von Fettsäuren und CLAs im Speziellen auf die durch PPAR α - und PPAR γ -vermittelte Regulation der *SCD* für das

Zusammenfassung

Pansenepithel ergeben, sind hieraus noch nicht abzuleiten. Sicher scheint, dass PUFAs im Pansen subtiler als reine PPAR α -Agonisten in die Regulation der *SCD* eingreifen.

3 Fazit

Mit Hilfe von primärkultivierten PEZ konnten neue Erkenntnisse über den Einfluss von Fettsäuren wie CLA c9t11 und t10c12, LA, OA und TVA auf die SCD, ein Enzym des Fettstoffwechsels, sowie auf die MCTs, welche essentielle Transportstrukturen im Pansen darstellen, gewonnen werden. Differierende Wirkungen, die auf Unterschiede im Sättigungsgrad oder in der Isomerie der Fettsäuren zurückgeführt werden könnten, haben sich nicht gezeigt. Inwiefern auch die nachgewiesenen Metaboliten der Fettsäuren an den Effekten beteiligt sind, ist aus den gewonnenen Daten nicht ableitbar. Der Nachweis der modulierenden Beteiligung des PPAR α und des PPAR γ an der Regulation der *SCD* zeigt, wie vielschichtig die Wirkung von ubiquitär vorkommenden Substanzen wie Fettsäuren ist. Ob die beschriebenen Effekte auch *in vivo* durch das Einwirken von Fettsäuren auf das intakte Pansenepithel auftreten oder ob sich die Fettsäuren, speziell die CLAs, welche durch Supplementierung in großen Mengen in den Organismus gelangen können, auch über die Blutseite auf das Pansenepithel auswirken, muss in weiterführenden Studien analysiert werden.

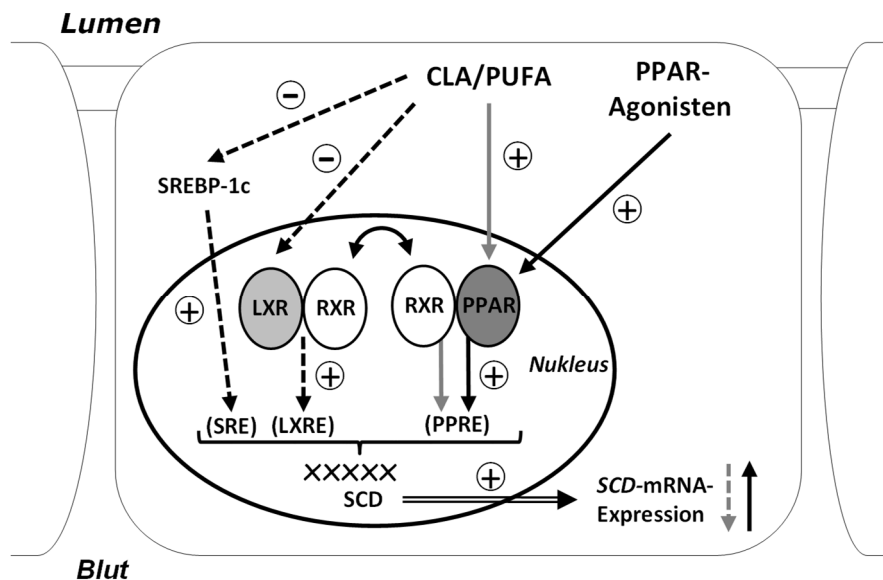


Abbildung 5. Möglicher Regulationsmechanismus der *SCD*-mRNA-Expression in den Pansenepithelzellen: PPAR als modulatorische Komponente im Zusammenspiel mit LXR und SREBP-1c. Zeichnung aus Montanaro et al. (2007) modifiziert nach Mauvoisin und Mounier (2011) und Masur et al. (2016). Negative (-----) und positive (——) Beeinflussung der *SCD*-mRNA-Expression durch CLA/PUFA mit dem gemeinsamen Ergebnis der Herunterregulierung der Expression (-----). Positive (——) Beeinflussung der *SCD*-mRNA-Expression durch PPAR-Agonisten mit dem Ergebnis der Heraufregulierung der Expression.

Literaturverzeichnis

- Abbott, S. K., P. L. Else, T. A. Atkins, und A. J. Hulbert. 2012. Fatty acid composition of membrane bilayers: importance of diet polyunsaturated fat balance. *Biochim. Biophys. Acta* 1818(5):1309–1317. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.011>.
- Agatha, G., A. Voigt, E. Kauf, und F. Zintl. 2004. Conjugated linoleic acid modulation of cell membrane in leukemia cells. *Cancer Lett.* 209(1):87–103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2003.11.022>.
- Aschenbach, J. R., S. Bilk, G. Tadesse, F. Stumpff, und G. Gäbel. 2009. Bicarbonate-dependent and bicarbonate-independent mechanisms contribute to nondiffusive uptake of acetate in the ruminal epithelium of sheep. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296(5):G1098–1107. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.90442.2008>.
- Aschenbach, J. R., G. B. Penner, F. Stumpff, und G. Gäbel. 2011. Ruminant Nutrition Symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *J. Anim. Sci.* 89(4):1092–1107. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2010-3301>.
- Banni, S., G. Carta, E. Angioni, E. Murru, P. Scanu, M. P. Melis, D. E. Bauman, S. M. Fischer, und C. Ip. 2001. Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. *J. Lipid Res.* 42(7):1056–1061.
- Banni, S., A. Petroni, M. Blasevich, G. Carta, E. Angioni, E. Murru, B. W. Day, M. P. Melis, S. Spada, und C. Ip. 2004a. Detection of conjugated C16 PUFAs in rat tissues as possible partial beta-oxidation products of naturally occurring conjugated linoleic acid and its metabolites. *Biochim. Biophys. Acta* 1682(1-3):120–127.
- Banni, S., A. Petroni, M. Blasevich, G. Carta, L. Cordeddu, E. Murru, M. P. Melis, A. Mahon, und M. A. Belury. 2004b. Conjugated linoleic acids (CLA) as precursors of a distinct family of PUFA. *Lipids* 39(11):1143–1146. <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-004-1341-0>.
- Barber, M. C., R. J. Ward, S. E. Richards, A. M. Salter, P. J. Buttery, R. G. Vernon, und M. T. Travers. 2000. Ovine adipose tissue monounsaturated fat content is correlated to depot-specific expression of the stearoyl-CoA desaturase gene. *J. Anim. Sci.* 78(1):62. <http://dx.doi.org/10.2527/2000.78162x>.
- Barzanti, V., M. Battino, A. Baracca, M. Cavazzoni, M. Cocchi, R. Noble, M. Maranesi, E. Turchetto, und G. Lenaz. 1994. The effect of dietary lipid changes on the fatty acid composition and function of liver, heart and brain mitochondria in the rat at different ages. *Br. J. Nutr.* 71(02):193. <http://dx.doi.org/10.1079/BJN19940126>.
- Bauman D.E., Baumgard L.H., Corl B.A., und Griinari J.M. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proceedings of the American Society of Animal Science*(50):1–15.
- Baumgard, L. H., J. K. Sangster, und D. E. Bauman. 2001. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). *J. Nutr.* 131(6):1764–1769.
- Benesch, F., F. Dengler, F. Masur, H. Pfannkuche, und G. Gäbel. 2014. Monocarboxylate transporters 1 and 4: expression and regulation by PPAR α in ovine ruminal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307(12):R1428–1437. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00408.2013>.
- Benjamin, S., T. Hanhoff, T. Borchers, und F. Spenner. 2005. An improved molecular test system for the screening of human PPAR transactivation by conjugated linoleic acid isomers and their precursor fatty acids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107(10):706–715. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200401041>.
- Bergman, E. N. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 70(2):567–590.

- Bergman, E. N., R. S. Reid, M. G. Murray, J. M. Brockway, und F. G. Whitelaw. 1965. Interconversions and production of volatile fatty acids in the sheep rumen. *Biochem. J.* 97(1):53–58.
- Bernal-Santos, G., J. W. Perfield, D. M. Barbano, D. E. Bauman, und T. R. Overton. 2003. Production Responses of Dairy Cows to Dietary Supplementation with Conjugated Linoleic Acid (CLA) During the Transition Period and Early Lactation. *J. Dairy Sci.* 86(10):3218–3228. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73925-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73925-3).
- Bernard, L., C. Leroux, H. Hayes, M. Gautier, Y. Chilliard, und P. Martin. 2001. Characterization of the caprine stearyl-CoA desaturase gene and its mRNA showing an unusually long 3'-UTR sequence arising from a single exon. *Gene* 281(1-2):53–61. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00822-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00822-8).
- Brown, J. M., M. S. Boysen, S. S. Jensen, R. F. Morrison, J. Storkson, R. Lea-Currie, M. Pariza, S. Mandrup, und M. K. McIntosh. 2003. Isomer-specific regulation of metabolism and PPARgamma signaling by CLA in human preadipocytes. *J. Lipid Res.* 44(7):1287–1300. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M300001-JLR200>.
- Buist, P. H. 2004. Fatty acid desaturases: selecting the dehydrogenation channel. *Nat. Prod. Rep.* 21(2):249–262. <http://dx.doi.org/10.1039/b302094k>.
- Bünger, M., van den Bosch, Heleen M., J. van der Meijde, S. Kersten, Hooiveld, Guido J. E. J., und M. Müller. 2007. Genome-wide analysis of PPAR α activation in murine small intestine. *Physiol. Genomics* 30(2):192–204. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00198.2006>.
- Burns, K. A., und J. P. Vanden Heuvel. 2007. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1771(8):952–960. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.04.018>.
- Chilliard, Y., F. Glasser, A. Ferlay, L. Bernard, J. Rouel, und M. Doreau. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109(8):828–855. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200700080>.
- Choi, Y., Y. C. Kim, Y. B. Han, Y. Park, M. W. Pariza, und J. M. Ntambi. 2000. The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.* 130(8):1920–1924.
- Choi, Y., Y. Park, M. W. Pariza, und J. M. Ntambi. 2001. Regulation of stearyl-CoA desaturase activity by the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284(3):689–693. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.5036>.
- Choi, Y., Y. Park, J. M. Storkson, M. W. Pariza, und J. M. Ntambi. 2002. Inhibition of stearyl-CoA desaturase activity by the cis-9, trans-11 isomer and the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294(4):785–790. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00554-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00554-5).
- Connor, E. E., R. L. Baldwin, C.-j. Li, R. W. Li, und H. Chung. 2013. Gene expression in bovine rumen epithelium during weaning identifies molecular regulators of rumen development and growth. *Funct. Integr. Genomics* 13(1):133–142. <http://dx.doi.org/10.1007/s10142-012-0308-x>.
- Corl, B. A., L. H. Baumgard, D. A. Dwyer, J. M. Griinari, B. S. Phillips, und D. E. Bauman. 2001. The role of Delta(9)-desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. *J. Nutr. Biochem.* 12(11):622–630.
- Cronan, J. 2002. Phospholipid modifications in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 5(2):202–205. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00297-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00297-7).
- Demizieux, L., P. Degrace, J. Gresti, O. Loreau, J. P. Noël, J. M. Chardigny, J. L. Sébédio, und P. Clouet. 2002. Conjugated linoleic acid isomers in mitochondria: evidence for an

- alteration of fatty acid oxidation. *J. Lipid Res.* 43(12):2112–2122.
<http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M200170-JLR200>.
- Dengler, F., R. Rackwitz, F. Benesch, H. Pfannkuche, und G. Gäbel. 2013. Bicarbonate-dependent transport of acetate and butyrate across the basolateral membrane of sheep rumen epithelium. *Acta Physiol. (Oxf)* 210(2):403–414.
<http://dx.doi.org/10.1111/apha.12155>.
- Dervishi, E., C. Serrano, M. Joy, M. Serrano, C. Rodellar, und J. H. Calvo. 2011. The effect of feeding system in the expression of genes related with fat metabolism in semitendinous muscle in sheep. *Meat Sci.* 89(1):91–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.003>.
- Duplus, E., M. Glorian, und C. Forest. 2000. Fatty acid regulation of gene transcription. *J. Biol. Chem.* 275(40):30749–30752. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R000015200>.
- Ebrahimi, M., M. A. Rajion, und Y. M. Goh. 2014. Effects of oils rich in linoleic and α -linolenic acids on fatty acid profile and gene expression in goat meat. *Nutrients* 6(9):3913–3928. <http://dx.doi.org/10.3390/nu6093913>.
- Ebrahimi, M., M. A. Rajion, Y. M. Goh, A. Q. Sazili, und J. T. Schonewille. 2013. Effect of linseed oil dietary supplementation on fatty acid composition and gene expression in adipose tissue of growing goats. *Biomed Res. Int.* 2013.
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/194625>.
- Eder, K., und R. Ringseis. 2010. Metabolism and actions of conjugated linoleic acids on atherosclerosis-related events in vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 54(1):17–36. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200900042>.
- Forman, B. M., J. Chen, und R. M. Evans. 1997. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(9):4312–4317.
- Fritsche, J., und H. Steinhart. 1998. Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. *Eur. Food Res. Technol.* 206(2):77–82.
<http://dx.doi.org/10.1007/s002170050218>.
- Gäbel, G., J. R. Aschenbach, und F. Müller. 2002. Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. *Anim. Health. Res. Rev.* 3(1):15–30.
<http://dx.doi.org/10.1079/AHRR200237>.
- Galamb, E., V. Faigl, M. Keresztes, Z. Csillik, A. Tröscher, P. Elek, M. Kulcsár, G. Huszenicza, H. Fébel, und F. Husvéth. 2016. Effect of pre- and post-partum supplementation with lipid-encapsulated conjugated linoleic acid on milk yield and metabolic status in multiparous high-producing dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. <http://dx.doi.org/10.1111/jpn.12544>.
- Glasser, F., M. Doreau, G. Maxin, und R. Baumont. 2013. Fat and fatty acid content and composition of forages: A meta-analysis. *Animal Feed Science and Technology* 185(1-2):19–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.06.010>.
- Glatz, J. F., und J. J. Luiken. 2015. Fatty acids in cell signaling: historical perspective and future outlook. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 92:57–62.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2014.02.007>.
- Gonzalez, C. I., und C. E. Martin. 1996. Fatty Acid-responsive Control of mRNA Stability. Unsaturated Fatty Acid-induced Degradation of the *Saccharomyces OLE1* Transcript. *J. Biol. Chem.* 271(42):25801–25809. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.42.25801>.
- Goosen, P. C. M. 1975. Absorption of Long-Chain fatty acids by Rumen Epithelium; Experiments in vivo and in vitro. *Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelkd.* 35(1-6):296–302. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0396.1975.tb01103.x>.
- Graham, C., I. Gatherar, I. Haslam, M. Glanville, und N. L. Simmons. 2007. Expression and localization of monocarboxylate transporters and sodium/proton exchangers in bovine rumen epithelium. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292(2):R997-1007.
<http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00343.2006>.

- Graham, C., und N. L. Simmons. 2005. Functional organization of the bovine rumen epithelium. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288(1):R173-181. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00425.2004>.
- Gray, K. A., L. C. Daugherty, S. M. Gordon, R. L. Seal, M. W. Wright, und E. A. Bruford. 2013. Genenames.org: the HGNC resources in 2013. *Nucleic Acids Res.* 41(D1):D545-552. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1066>.
- Griinari, J. M., B. A. Corl, S. H. Lacy, P. Y. Chouinard, K. V. Nurmela, und D. E. Bauman. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *J. Nutr.* 130(9):2285-2291.
- Ha, Y. L., N. K. Grimm, und M. W. Pariza. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8(12):1881-1887.
- Halestrap, A. P. 2012. The monocarboxylate transporter family - Structure and Functional Characterization. *IUBMB life* 64(1):1-9. <http://dx.doi.org/10.1002/iub.573>.
- Halestrap, A. P. 2013. Monocarboxylic acid transport. *Compr. Physiol.* 3(4):1611-1643. <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c130008>.
- Heinemann, F. S., und J. Ozols. 1998. Degradation of Stearoyl-Coenzyme A Desaturase: Endoproteolytic Cleavage by an Integral Membrane Protease. *Mol. Biol. Cell* 9(12):3445-3453. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.9.12.3445>.
- Hötger, K., H. M. Hammon, C. Weber, S. Görs, A. Tröschler, R. M. Bruckmaier, und C. C. Metges. 2013. Supplementation of conjugated linoleic acid in dairy cows reduces endogenous glucose production during early lactation. *J. Dairy Sci.* 96(4):2258-2270. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6127>.
- Houseknecht, K. L., J. P. Vanden Heuvel, S. Y. Moya-Camarena, C. P. Portocarrero, L. W. Peck, K. P. Nickel, und M. A. Belury. 1998. Dietary Conjugated Linoleic Acid Normalizes Impaired Glucose Tolerance in the Zucker Diabetic Fattyfa/faRat. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 244(3):678-682. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1998.8303>.
- Issemann, I., R. A. Prince, J. D. Tugwood, und S. Green. 1993. The peroxisome proliferator-activated receptor: Retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs. *J. Mol. Endocrinol.* 11(1):37-47. <http://dx.doi.org/10.1677/jme.0.0110037>.
- Jaudszus, A., R. Kramer, M. Pfeuffer, A. Roth, G. Jahreis, und K. Kuhnt. 2014. trans Palmitoleic acid arises endogenously from dietary vaccenic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 99(3):431-435. <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.113.076117>.
- Jenkins, T. C. 1993. Lipid Metabolism in the Rumen. *J. Dairy Sci.* 76(12):3851-3863. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77727-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77727-9).
- Jenkins, T. C., und W. C. Bridges. 2007. Protection of fatty acids against ruminal biohydrogenation in cattle. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109(8):778-789. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200700022>.
- Jenkins, T. C., R. J. Wallace, P. J. Moate, und E. E. Mosley. 2008. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* 86(2):397-412.
- Ji, P., J. K. Drackley, M. J. Khan, und J. J. Loo. 2014. Inflammation- and lipid metabolism-related gene network expression in visceral and subcutaneous adipose depots of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 97(6):3441-3448. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7296>.
- Jump, D., D. Botolin, Y. Wang, J. Xu, und B. Christian. 2006. Fatty acids and gene transcription. *Scand. J. Food Nutr.* 50(1):5-12. <http://dx.doi.org/10.1080/17482970601069318>.
- Kang, K., W. Liu, K. J. Albright, Y. Park, und M. W. Pariza. 2003. trans-10, cis-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR γ expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303(3):795-799. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00413-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00413-3).

- Keating, A. F., J. J. Kennelly, und F.-Q. Zhao. 2006. Characterization and regulation of the bovine stearoyl-CoA desaturase gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344(1):233–240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.133>.
- Keller, H., C. Dreyer, J. Medin, A. Mahfoudi, K. Ozato, und W. Wahli. 1993. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(6):2160–2164.
- Kepler, C. R., K. P. Hirons, J. J. McNeill, und S. B. Tove. 1966. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 241(6):1350–1354.
- Keweloh, H., und H. J. Heipieper. 1996. Trans unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* 31(2):129–137.
- Kim, Y. J., R. H. Liu, J. L. Rychlik, und J. B. Russell. 2002. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. *J. Appl. Microbiol.* 92(5):976–982. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01610.x>.
- Kinsella, J. E. 1972. Stearyl CoA as a precursor of oleic acid and glycerolipids in mammary microsomes from lactating bovine: Possible regulatory step in milk triglyceride synthesis. *Lipids* 7(5):349–355. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02532654>.
- Kirat, D., J. Masuoka, H. Hayashi, H. Iwano, H. Yokota, H. Taniyama, und S. Kato. 2006. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen. *J. Physiol. (Lond.)* 576(2):635–647. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2006.115931>.
- Kirat, D., Y. Matsuda, N. Yamashiki, H. Hayashi, und S. Kato. 2007. Expression, cellular localization, and functional role of monocarboxylate transporter 4 (MCT4) in the gastrointestinal tract of ruminants. *Gene* 391(1-2):140–149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2006.12.020>.
- Kliwer, S. A., B. M. Forman, B. Blumberg, E. S. Ong, U. Borgmeyer, D. J. Mangelsdorf, K. Umesono, und R. M. Evans. 1994. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(15):7355–7359.
- Kliwer, S. A., S. S. Sundseth, S. A. Jones, P. J. Brown, G. B. Wisely, C. S. Koble, P. Devchand, W. Wahli, T. M. Willson, J. M. Lenhard, und J. M. Lehmann. 1997. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(9):4318–4323.
- Kliwer, S. A., K. Umesono, D. J. Noonan, R. A. Heyman, und R. M. Evans. 1992. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358(6389):771–774. <http://dx.doi.org/10.1038/358771a0>.
- König, B., S. Fischer, S. Schlötte, G. Wen, K. Eder, und G. I. Stangl. 2010. Monocarboxylate transporter 1 and CD147 are up-regulated by natural and synthetic peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists in livers of rodents and pigs. *Mol. Nutr. Food Res.* 54(9):1248–1256. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200900432>.
- König, B., A. Koch, K. Giggel, B. Dordschbal, K. Eder, und G. I. Stangl. 2008. Monocarboxylate transporter (MCT)-1 is up-regulated by PPARalpha. *Biochim. Biophys. Acta* 1780(6):899–904. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.002>.
- Kramer, J. K., P. W. Parodi, R. G. Jensen, M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz, und R. O. Adlof. 1998. Rumenic acid: a proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. *Lipids* 33(8):835.
- Krey, G., O. Braissant, F. L'Horset, E. Kalkhoven, M. Perroud, M. G. Parker, und W. Wahli. 1997. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of

- peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol. Endocrinol.* 11(6):779–791. <http://dx.doi.org/10.1210/mend.11.6.0007>.
- Lee, K. N., M. W. Pariza, und J. M. Ntambi. 1998. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearoyl-CoA desaturase mRNA expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248(3):817–821. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1998.8994>.
- Lefebvre, P., G. Chinetti, J. C. Fruchart, und B. Staels. 2006. Sorting out the roles of PPAR in energy metabolism and vascular homeostasis. *J. Clin. Invest.* 116(3):571–580. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI27989>.
- Lehmann, J. M., L. B. Moore, T. A. Smith-Oliver, W. O. Wilkison, T. M. Willson, und S. A. Kliewer. 1995. An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ). *J. Biol. Chem.* 270(22):12953–12956. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.22.12953>.
- Lehnen, T. E., da Silva, Marcondes Ramos, A. Camacho, A. Marcadenti, und A. M. Lehnen. 2015. A review on effects of conjugated linoleic fatty acid (CLA) upon body composition and energetic metabolism. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 12:36. <http://dx.doi.org/10.1186/s12970-015-0097-4>.
- Lengi, A. J., und B. A. Corl. 2007. Identification and characterization of a novel bovine stearoyl-CoA desaturase isoform with homology to human SCD5. *Lipids* 42(6):499–508. <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-007-3056-2>.
- Lengi, A. J., und B. A. Corl. 2015. Bovine brain region-specific stearoyl-CoA desaturase expression and fatty acid composition. *Lipids* 50(6):555–563. <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-015-4015-y>.
- Lin, X., J. J. Loor, und J. H. Herbein. 2004. Trans 10, cis 12-18:2 is a more potent inhibitor of de novo fatty acid synthesis and desaturation than cis 9, trans 11-18:2 in the mammary gland of lactating mice. *J. Nutr.* 134(6):1362–1368.
- Loor, J. J., und J. H. Herbein. 1998. Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting de novo fatty acid synthesis. *J. Nutr.* 128(12):2411–2419.
- Lourenço, M., E. Ramos-Morales, und R. J. Wallace. 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal* 4(7):1008–1023.
- Ma, D. W. L., A. A. Wierzbicki, C. J. Field, und M. T. Clandinin. 1999. Preparation of conjugated linoleic acid from safflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76(6):729–730. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-999-0167-3>.
- Mandard, S., M. Müller, und S. Kersten. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cell. Mol. Life Sci.* 61(4):393–416. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-003-3216-3>.
- Martin, G. S., D. K. Lunt, K. G. Britain, und S. B. Smith. 1999. Postnatal development of stearoyl coenzyme A desaturase gene expression and adiposity in bovine subcutaneous adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 77(3):630–636.
- Masur, F., F. Benesch, H. Pfannkuche, H. Fuhrmann, und G. Gäbel. 2016. Conjugated linoleic acids influence fatty acid metabolism in ovine ruminal epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 99(4):3081–3095. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10042>.
- Mauvoisin, D., und C. Mounier. 2011. Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. *Biochimie* 93(1):78–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.08.001>.
- Michalik, L., J. Auwerx, J. P. Berger, V. K. Chatterjee, C. K. Glass, F. J. Gonzalez, P. A. Grimaldi, T. Kadowaki, M. A. Lazar, S. O'Rahilly, C. N. A. Palmer, J. Plutzky, J. K. Reddy, B. M. Spiegelman, B. Staels, und W. Wahli. 2006. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol. Rev.* 58(4):726–741. <http://dx.doi.org/10.1124/pr.58.4.5>.
- Miller, C. W., und J. M. Ntambi. 1996. Peroxisome proliferators induce mouse liver stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(18):9443–9448.

- Minville-Walz, M., J. Gresti, L. Pichon, S. Bellenger, J. Bellenger, M. Narce, und M. Rialland. 2012. Distinct regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression by cis and trans C18:1 fatty acids in human aortic smooth muscle cells. *Genes Nutr.* 7(2):209–216. <http://dx.doi.org/10.1007/s12263-011-0258-2>.
- Montanaro, M. A., M. S. González, A. M. Bernasconi, und R. R. Brenner. 2007. Role of liver X receptor, insulin and peroxisome proliferator activated receptor alpha on in vivo desaturase modulation of unsaturated fatty acid biosynthesis. *Lipids* 42(3):197–210. <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-006-3006-4>.
- Moon, H.-S., H.-G. Lee, C.-S. Chung, Y.-J. Choi, und C.-S. Cho. 2008. Physico-chemical modifications of conjugated linoleic acid for ruminal protection and oxidative stability. *Nutr. Metab. (Lond)* 5:16. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-7075-5-16>.
- Mosley, E. E., M. K. McGuire, J. E. Williams, und M. A. McGuire. 2006. Cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is synthesized from vaccenic acid in lactating women. *J. Nutr.* 136(9):2297–2301.
- Mosley, E. E., G. L. Powell, M. B. Riley, und T. C. Jenkins. 2002. Microbial biohydrogenation of oleic acid to trans isomers in vitro. *J. Lipid Res.* 43(2):290–296.
- Moya-Camarena, S. Y., und M. A. Belury. 1999. Species Differences in the Metabolism and Regulation of Gene Expression by Conjugated Linoleic Acid. *Nutr. Rev.* 57(11):336–340. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.1999.tb06910.x>.
- Moya-Camarena, S. Y., J. P. Vanden Heuvel, und M. A. Belury. 1999a. Conjugated linoleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha and beta subtypes but does not induce hepatic peroxisome proliferation in Sprague-Dawley rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1436(3):331–342.
- Moya-Camarena, S. Y., J. P. Vanden Heuvel, S. G. Blanchard, L. A. Leesnitzer, und M. A. Belury. 1999b. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPARalpha. *J. Lipid Res.* 40(8):1426–1433.
- Müller, A., R. Ringseis, K. Düsterloh, S. Gahler, K. Eder, und H. Steinhart. 2005. Detection of conjugated dienoic fatty acids in human vascular smooth muscle cells treated with conjugated linoleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1737(2-3):145–151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.09.011>.
- Müller, F., K. Huber, H. Pfannkuche, J. R. Aschenbach, G. Breves, und G. Gäbel. 2002. Transport of ketone bodies and lactate in the sheep ruminal epithelium by monocarboxylate transporter 1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283(5):G1139–1146. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00268.2001>.
- Mziaut, H., G. Korza, und J. Ozols. 2000. The N terminus of microsomal Delta 9 stearoyl-CoA desaturase contains the sequence determinant for its rapid degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(16):8883–8888. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.16.8883>.
- Ntambi, J. M. 1995. The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog. Lipid Res.* 34(2):139–150. [http://dx.doi.org/10.1016/0163-7827\(94\)00010-J](http://dx.doi.org/10.1016/0163-7827(94)00010-J).
- Ntambi, J. M. 1999. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J. Lipid Res.* 40(9):1549–1558.
- Ntambi, J. M., und M. Miyazaki. 2003. Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1. *Curr. Opin. Lipidol.* 14(3):255–261. <http://dx.doi.org/10.1097/01.mol.0000073502.41685.c7>.
- Obsen, T., N. J. Faergeman, S. Chung, K. Martinez, S. Gobern, O. Loreau, M. Wabitsch, S. Mandrup, und M. McIntosh. 2012. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases de novo lipid synthesis in human adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 23(6):580–590. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.02.014>.
- Odens, L. J., R. Burgos, M. Innocenti, M. J. VanBaale, und L. H. Baumgard. 2007. Effects of varying doses of supplemental conjugated linoleic acid on production and energetic variables during the transition period. *J. Dairy Sci.* 90(1):293–305. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72630-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72630-9).

- Oikawa, D., T. Nakanishi, Y.-n. Nakamura, T. Yamamoto, A. Yamaguchi, N. Shiba, H. Iwamoto, T. Tachibana, and M. Furuse. 2005. Modification of skin composition by conjugated linoleic acid alone or with combination of other fatty acids in mice. *Br. J. Nutr.* 94(2):275–281. <http://dx.doi.org/10.1079/BJN20051488>.
- Ostrowska, E., R. F. Cross, M. Muralitharan, D. E. Bauman, and F. R. Dunshea. 2003. Dietary conjugated linoleic acid differentially alters fatty acid composition and increases conjugated linoleic acid content in porcine adipose tissue. *Br. J. Nutr.* 90(5):915–928. <http://dx.doi.org/10.1079/BJN2003982>.
- Pappritz, J., P. Lebzien, U. Meyer, G. Jahreis, R. Kramer, G. Flachowsky, and S. Dänicke. 2011. Duodenal availability of conjugated linoleic acids after supplementation to dairy cow diets. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113(12):1443–1455. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201100170>.
- Park, Y., J. M. Storkson, K. J. Albright, W. Liu, and M. W. Pariza. 2005. Biological activities of conjugated fatty acids: conjugated eicosadienoic (conj. 20:2 delta (c11, t13/t12, c14)), eicosatrienoic (conj. 20:3 delta (c8, t12, c14)), and heneicosadienoic (conj. 21:2 delta (c12, t14/c13, t15)) acids and other metabolites of conjugated linoleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1687(1-3):120–129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.11.010>.
- Paton, C. M., and J. M. Ntambi. 2009. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297(1):E28-37. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.90897.2008>.
- Perfield, J. W., A. L. Lock, A. M. Pfeiffer, and D. E. Bauman. 2004. Effects of amide-protected and lipid-encapsulated conjugated linoleic acid supplements on milk fat synthesis. *J. Dairy Sci.* 87(9):3010–3016. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73432-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73432-3).
- Pfannkuche, H., F. Taifour, J. Steinhoff-Wagner, H. M. Hammon, and G. Gäbel. 2013. Post-natal changes in MCT1 expression in the forestomach of calves. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)* 98(1):140–148. <http://dx.doi.org/10.1111/jpn.12057>.
- Pollard, M. R., F. D. Gunstone, A. T. James, and L. J. Morris. 1980. Desaturation of positional and geometric isomers of monoenoic fatty acids by microsomal preparations from rat liver. *Lipids* 15(5):306–314.
- Purushotham, A., G. E. Shrode, A. A. Wendel, L.-F. Liu, and M. A. Belury. 2007. Conjugated linoleic acid does not reduce body fat but decreases hepatic steatosis in adult Wistar rats. *J. Nutr. Biochem.* 18(10):676–684. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.10.008>.
- Rezamand, P., J. S. Watts, K. M. Yavah, E. E. Mosley, L. Ma, B. A. Corl, and M. A. McGuire. 2014. Relationship between stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression, relative protein abundance, and its fatty acid products in bovine tissues. *J. Dairy Res.* 81(3):333–339. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029914000181>.
- Ringseis, R., A. Müller, K. Düsterloh, S. Schleser, K. Eder, and H. Steinhart. 2006. Formation of conjugated linoleic acid metabolites in human vascular endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1761(3):377–383. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.02.005>.
- Ritzhaupt, A., I. S. Wood, A. Ellis, K. B. Hosie, and S. P. Shirazi-Beechey. 1998. Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: its potential to transport L-lactate as well as butyrate. *J. Physiol. (Lond.)* 513(3):719–732. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.719ba.x>.
- Sampath, H., and J. M. Ntambi. 2014. Role of stearoyl-CoA desaturase-1 in skin integrity and whole body energy balance. *The Journal of biological chemistry* 289(5):2482–2488. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R113.516716>.
- Schoonjans, K., B. Staels, and J. Auwerx. 1996. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation.

- Biochim. Biophys. Acta 1302(2):93–109. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760\(96\)00066-5](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760(96)00066-5).
- Sébédio, J. L., E. Angioni, J. M. Chardigny, S. Gregoire, P. Juaneda, und O. Berdeaux. 2001. The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty acid profiles of liver and adipose tissues and their conversion to isomers of 16:2 and 18:3 conjugated fatty acids in rats. *Lipids* 36(6):575–582.
- Sébédio, J. L., P. Juaneda, G. Dobson, I. Ramilison, J. C. Martin, J. M. Chardigny, und W. W. Christie. 1997. Metabolites of conjugated isomers of linoleic acid (CLA) in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1345(1):5–10. [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2760\(97\)00015-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2760(97)00015-5).
- Sébédio, J. L., P. Juaneda, S. Gregoire, J. M. Chardigny, J. C. Martin, und C. Ginies. 1999. Geometry of conjugated double bonds of CLA isomers in a commercial mixture and in their hepatic 20:4 metabolites. *Lipids* 34(12):1319–1325. <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-999-0484-3>.
- Seidel A. 2004. Der Einfluss langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf die Fettsäurezusammensetzung einer caninen Mastocytenzelllinie. Dissertation, Leipzig.
- Sessler, A. M., N. Kaur, J. P. Palta, und J. M. Ntambi. 1996. Regulation of Stearoyl-CoA Desaturase 1 mRNA Stability by Polyunsaturated Fatty Acids in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 271(47):29854–29858. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.47.29854>.
- Shanklin, J., J. E. Guy, G. Mishra, und Y. Lindqvist. 2009. Desaturases: emerging models for understanding functional diversification of diiron-containing enzymes. *J. Biol. Chem.* 284(28):18559–18563. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R900009200>.
- Siciliano-Jones, J., und M. R. Murphy. 1989. Production of Volatile Fatty Acids in the Rumen and Cecum-Colon of Steers as Affected by Forage: Concentrate and Forage Physical Form. *J. Dairy Sci.* 72(2):485–492. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79130-X](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79130-X).
- Smith, S. B., T. S. Hively, G. M. Cortese, J. J. Han, K. Y. Chung, P. Castenada, C. D. Gilbert, V. L. Adams, und H. J. Mersmann. 2002. Conjugated linoleic acid depresses the delta 9 desaturase index and stearoyl coenzyme A desaturase enzyme activity in porcine subcutaneous adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 80(8):2110–2115. <http://dx.doi.org/10.2527/2002.8082110x>.
- Soosten, D. von, U. Meyer, E. M. Weber, J. Rehage, G. Flachowsky, und S. Dänicke. 2011. Effect of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on performance, adipose depot weights, and liver weight in early-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94(6):2859–2870. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3851>.
- Sperling, P., P. Ternes, T. Zank, und E. Heinz. 2003. The evolution of desaturases. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 68(2):73–95. [http://dx.doi.org/10.1016/S0952-3278\(02\)00258-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0952-3278(02)00258-2).
- St John, L C, D. K. Lunt, und S. B. Smith. 1991. Fatty acid elongation and desaturation enzyme activities of bovine liver and subcutaneous adipose tissue microsomes. *J. Anim. Sci.* 69(3):1064–1073. <http://dx.doi.org/10.2527/1991.6931064x>.
- Steinhart, H., R. Rickert, und K. Winkler. 2003. Identification and analysis of conjugated linoleic acid isomers (CLA). *Eur. J. Med. Res.* 8(8):370–372.
- Stumpff, F., M.-I. Georgi, L. Mundhenk, I. Rabbani, M. Fromm, H. Martens, und D. Gunzel. 2011. Sheep rumen and omasum primary cultures and source epithelia: barrier function aligns with expression of tight junction proteins. *J. Exp. Biol.* 214(Pt 17):2871–2882. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.055582>.
- Troegeler-Meynadier, A., L. Bret-Bennis, und F. Enjalbert. 2006. Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reprod. Nutr. Dev.* 46(6):713–724. <http://dx.doi.org/10.1051/rnd:2006046>.

- Veth, M. J. de, D. E. Bauman, W. Koch, G. E. Mann, A. M. Pfeiffer, und W. R. Butler. 2009. Efficacy of conjugated linoleic acid for improving reproduction: a multi-study analysis in early-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92(6):2662–2669. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1845>.
- Veth, M. J. de, S. K. Gulati, N. D. Luchini, und D. E. Bauman. 2005. Comparison of Calcium Salts and Formaldehyde-Protected Conjugated Linoleic Acid in Inducing Milk Fat Depression. *J. Dairy Sci.* 88(5):1685–1693. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72840-X](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72840-X).
- Wallace, R. J., N. McKain, K. J. Shingfield, und E. Devillard. 2007. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *J. Lipid Res.* 48(10):2247–2254. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M700271-JLR200>.
- Ward, R. J., M. T. Travers, S. E. Richards, R. G. Vernon, A. M. Salter, P. J. Buttery, und M. C. Barber. 1998. Stearoyl-CoA desaturase mRNA is transcribed from a single gene in the ovine genome. *Biochim. Biophys. Acta* 1391(2):145–156. [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2760\(97\)00210-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2760(97)00210-5).
- Willson, T. M., J. E. Cobb, D. J. Cowan, R. W. Wiethe, I. D. Correa, S. R. Prakash, K. D. Beck, L. B. Moore, S. A. Kliewer, und J. M. Lehmann. 1996. The Structure–Activity Relationship between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Agonism and the Antihyperglycemic Activity of Thiazolidinediones. *J. Med. Chem.* 39(3):665–668. <http://dx.doi.org/10.1021/jm950395a>.
- Wood, R. D., M. C. Bell, R. B. Grainger, und R. A. Teekell. 1963. Metabolism of Labeled Linoleic-1-C¹⁴ Acid in the Sheep Rumen. *J. Nutr.* 79(1):62–68.
- Yue, Y., X. Cheng, S. G. Zhao, Z. Liu, L. S. Liu, R. Zhou, J. P. Wu, und M. A. Brown. 2016. Effects of tail docking on the expression of genes related to lipid metabolism in Lanzhou fat-tailed sheep. *Genet. Mol. Res.* 15(1). <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15017323>.
- Zulkifli, R. M., T. Parr, A. M. Salter, und J. M. Brameld. 2010. Regulation of ovine and porcine stearoyl coenzyme A desaturase gene promoters by fatty acids and sterols. *J. Anim. Sci.* 88(8):2565–2575. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2009-2603>.

Anhang (Supplemental Material)

Ergänzend sind hier einige Aspekte der Methodik dargestellt, die Grundlage der Etablierung der Omegawax 320 GC-Säule (30m x 0,32mm x 0,25 µm Film, Supelco Cat.-Nr. 24152) sowie der Originalarbeit sind.

Peakidentifikation auf der Omegawax 320 GC-Säule

Die eindeutige Zuordnung der einzelnen Elutionspeaks zu den entsprechenden Fettsäuren erfolgte durch die Kombination mehrerer Vorgehensweisen:

- Identifizierung mit Hilfe von Referenzstandards
- Identifizierung durch den direkten Vergleich der unterschiedlich behandelten Proben
- Identifizierung durch Kopplung der Gaschromatographie mit Massenspektrometrie

Abbildung A1, A2 und A3 zeigen exemplarisch die Chromatogramme je einer mit CLA c9t11, mit CLA t10c12, mit Ölsäure, mit Linolsäure oder mit trans-Vaccensäure behandelten Probe im Vergleich zum Fettsäuremuster einer Probe von Pansenepithelzellen, die unter Kontrollbedingungen, das heißt ohne Behandlung, kultiviert wurde. Zusätzlich ist der quantitative Fim-Fame-6 Referenzstandard (Matreya LLC, State College, PA) aufgetragen. Für die Identifizierung standen außerdem der Supelco 37 Component FAME Mix, der PUFA No. 3, der Linoleic acid methyl ester mix (cis/trans) und der Omegawax Column Test Mix (alle Supelco, Bellefonte, PA) sowie die CLA C18:2 *cis*-9, *trans*-11 CLA C18:2 *trans*-10, *cis*-12, C18:1 *trans*-11, C20:2 all-*cis*-5,8,11,14,17 (Eicosapentaensäure) und C22:5 all-*cis*-7,10,13,16,19 (Docosapentaensäure) als Einzelsubstanzen zur Verfügung. Kurzkettige Fettsäuren (<C13:0) sind auf Grund des niedrigen Siedepunktes auf der Säule unter den gewählten Bedingungen nicht messbar, besitzen für tierische Zellen in der Regel aber auch keine Relevanz.

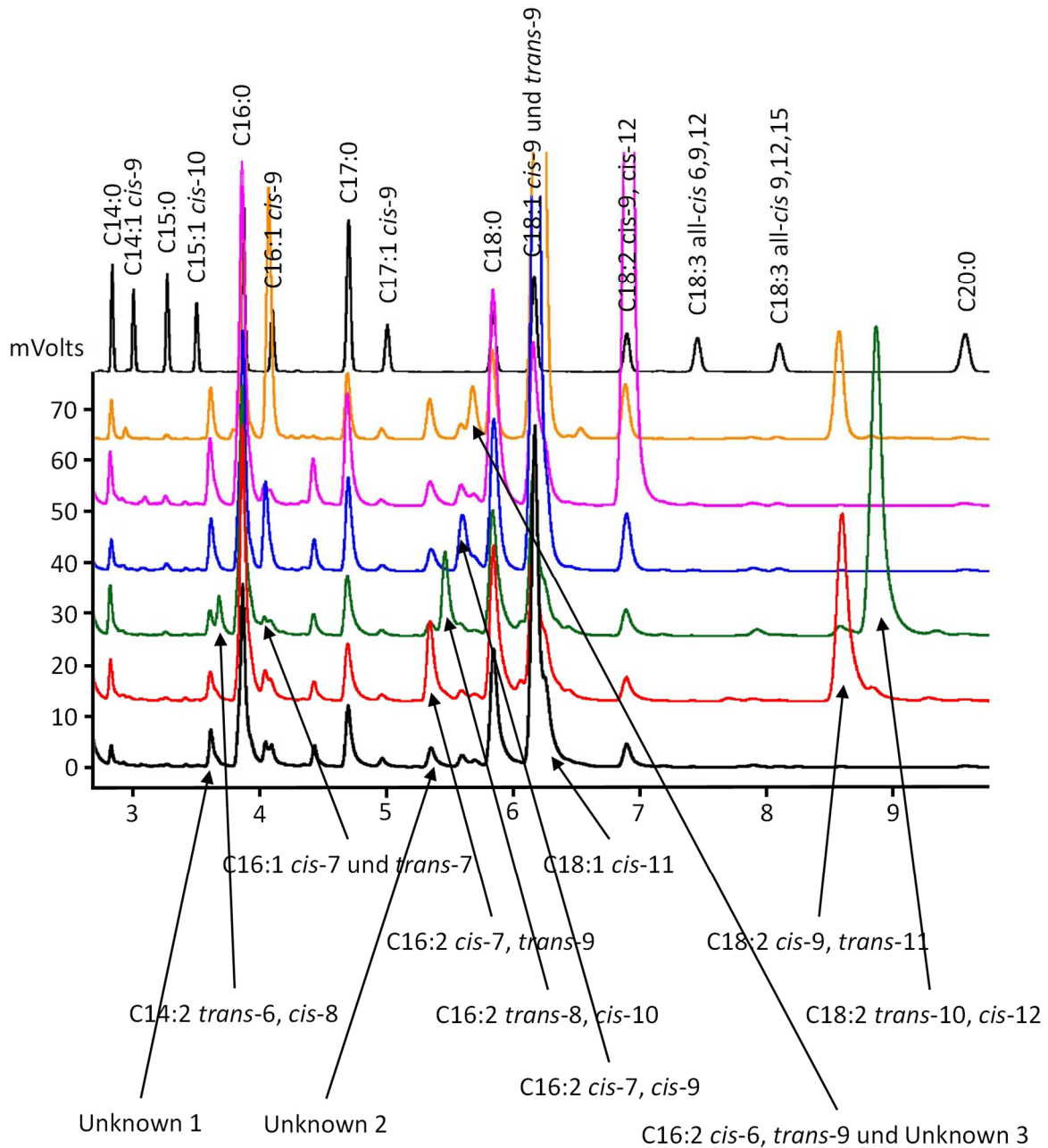


Abb. A1. Beispielchromatogramme der Fettsäuremethylester von unterschiedlich behandelten und anschließend lysierten Zellen: schwarz (unten) = Zellen unter Kontrollbedingungen gewachsen, rot = CLA c9t11-behandelte Zellen, grün = CLA t10c12-behandelte Zellen, blau = Ölsäure-behandelte Zellen, pink = Linolsäure-behandelte Zellen, gelb = *trans*-Vaccensäure-behandelte Zellen, schwarz (oben) = Fim-Fame-6 Referenzstandard

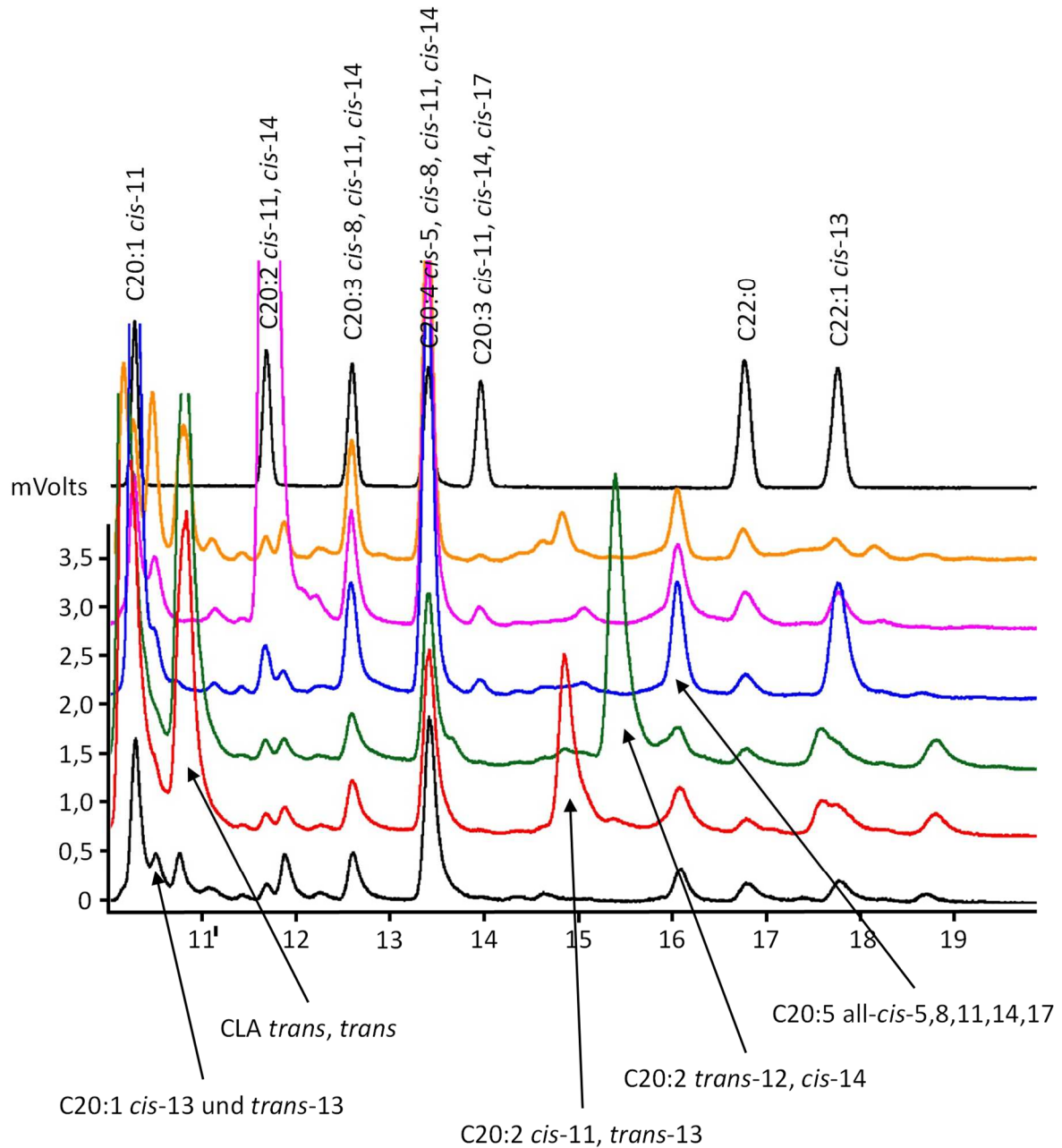


Abb. A2. Beispielchromatogramme der Fettsäuremethylester von unterschiedlich behandelten und anschließend lysierten Zellen: schwarz (unten) = Zellen unter Kontrollbedingungen gewachsen, rot = CLA c9t11-behandelte Zellen, grün = CLA t10c12-behandelte Zellen, blau = Ölsäure-behandelte Zellen, pink = Linolsäure-behandelte Zellen, gelb = *trans*-Vaccensäure-behandelte Zellen, schwarz (oben) = Fim-Fame-6 Referenzstandard

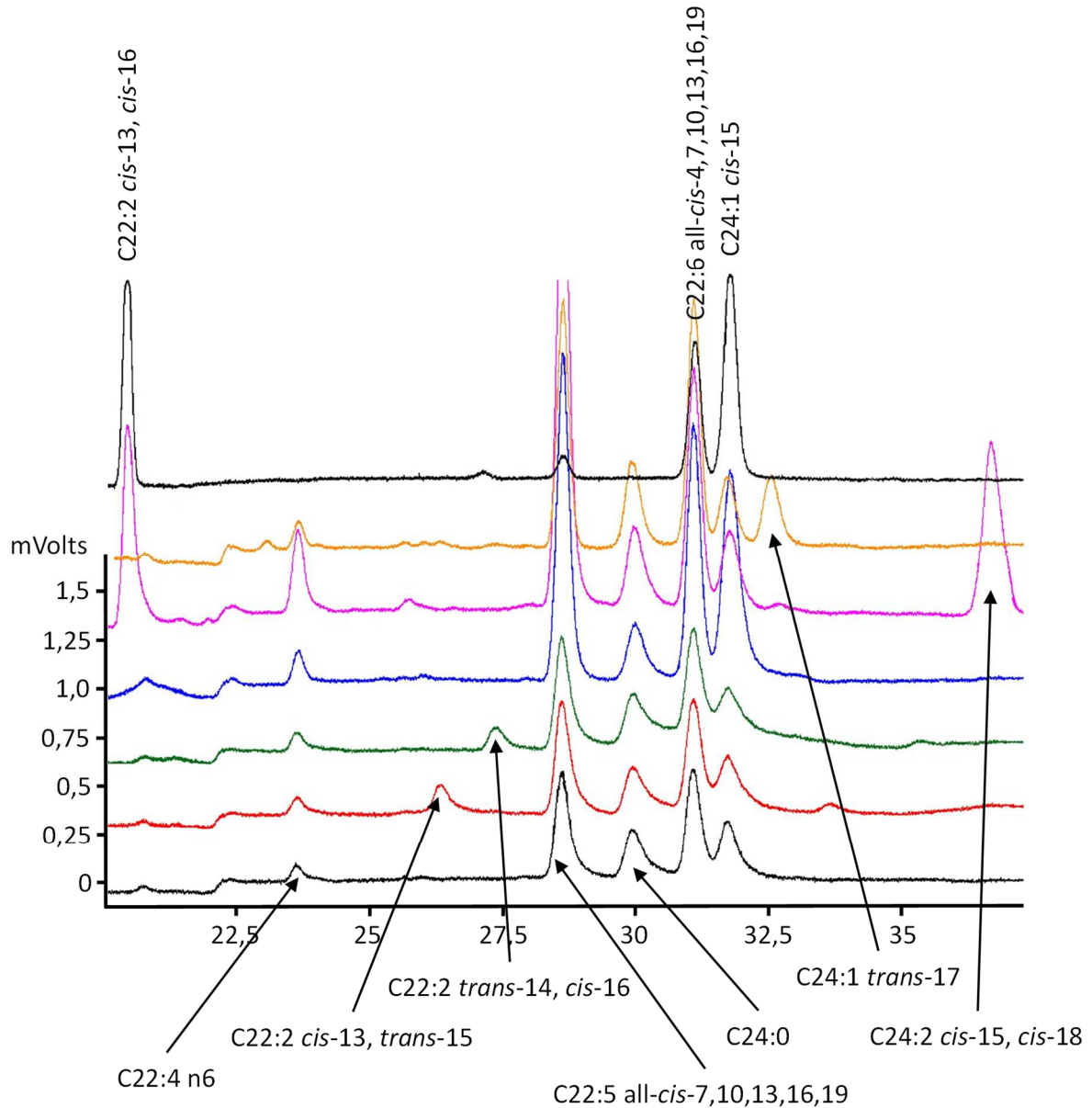


Abb. A3. Beispielchromatogramme der Fettsäuremethylester von unterschiedlich behandelten und anschließend lysierten Zellen: schwarz (unten) = Zellen unter Kontrollbedingungen gewachsen, rot = CLA c9t11-behandelte Zellen, grün = CLA t10c12-behandelte Zellen, blau = Ölsäure-behandelte Zellen, pink = Linolsäure-behandelte Zellen, gelb = *trans*-Vaccensäure-behandelte Zellen, schwarz (oben) = Fim-Fame-6 Referenzstandard

Auswertung der Fettsäuregehalte auf der Omegawax 320 GC-Säule

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit dem Programm Star 6.0 von VARIAN. Anhand von Vorversuchen wurden alle relevanten Peaks ausgewählt und mit einer Kombination aus automatischer (Signal-Rauschverhältnis: 5, Peakweite: 1 sec, minimale Peakfläche: 50 $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$) und händischer Integration - wie bei Seidel A. (2004) beschrieben - erfasst. Dies beinhaltete folgende Optionen:

- „forced peak“: Festlegung eines Peaks mit einer Fläche kleiner als 50 $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$
- „split peak“: Trennung durch Lotfällung von nicht bis zur Basislinie getrennten Peaks oder Abtrennung von Störpeaks
- Korrektur von Peakstart- und Peakendmarken bei einer unruhigen Basislinie

Die Berechnung der Konzentration der einzelnen Fettsäurenmethylester in den Proben aus der Peakfläche erfolgte ebenfalls über das Computerprogramm Star 6.0 unter Einbeziehung der Konzentration des Internen Standards und der Responsefaktoren (RF) mit anschließender Umrechnung, welche das Molekulargewicht der entsprechenden Fettsäure berücksichtigte. Die Ergebnisse wurden jeweils in der Einheit nmol pro 1 mg Gesamtprotein angegeben.

Responsefaktoren

Die RFs wurden mit dem quantitativen Fim-Fame-6 Referenzstandard sowie erhältlichen Einzelsubstanzen bestimmt. Wo keine Einzelsubstanzen erhältlich waren wurde der RF anhand der in Abbildung A4 dargestellten Regelmäßigkeit geschätzt. Folgendes hat sich dabei herausgestellt:

- Bei gleicher Anzahl an Doppelbindungen nimmt der RF mit der Anzahl der C-Atome zu.
- Bei gleicher Anzahl an C-Atomen sinkt der RF mit Zunahme der Doppelbindungen. Jedoch gilt dies nur für 0, 1 und 2 Doppelbindungen bis zu einer Kettenlänge von C20. Bei höherer Kettenlänge und mehr als 2 Doppelbindungen werden die Abweichungen von der Regelmäßigkeit größer.

Supplemental Material

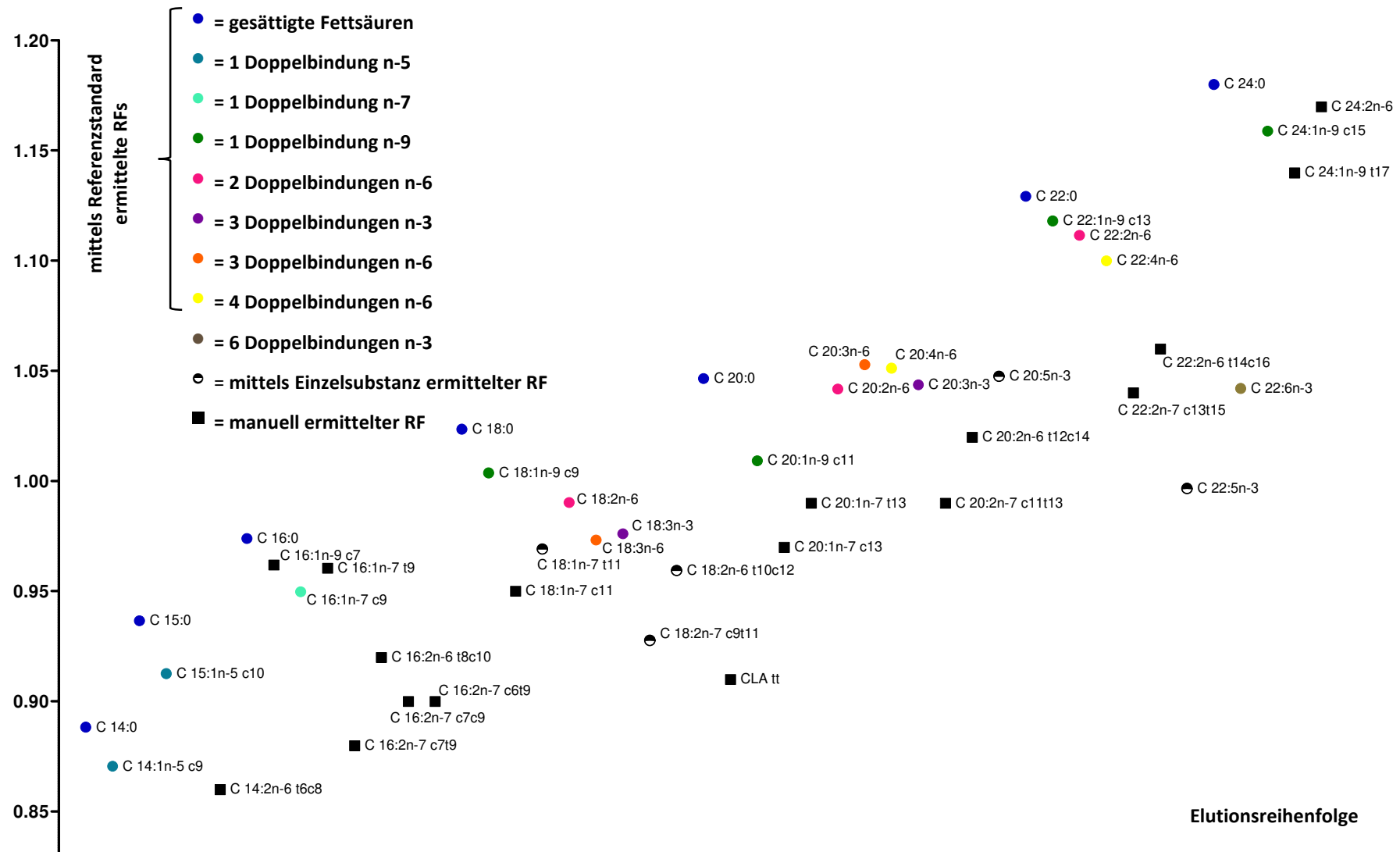


Abb. A4. Grafische Darstellung der Responsefaktoren

Supplemental Material

Tab. A1. Elutionsreihenfolge und Responsefaktoren der Fettsäuren

| Kurzformel | Systematischer Name | Trivialname | Response-faktor |
|-------------------------------|--|--------------------------------|--------------------|
| C 14:0 | n-Tetradecansäure | Myristinsäure | 0,88824 |
| Unknown 1 | | | 0,83 [#] |
| C 14:2n-6 t6c8 | Tetradecadiensäure (konjugiert) | | 0,86 [#] |
| C 16:0 | n-Hexadecansäure | Palmitinsäure | 0,97391 |
| C 16:1n-9 c7 | <i>cis</i> -7-Hexadecensäure | | 0,962 [#] |
| C 16:1n-7 c9 | <i>cis</i> -9-Hexadecensäure | Palmitoleinsäure | 0,94976 |
| C 16:1n-7 t9 | <i>trans</i> -9-Hexadecensäure | <i>trans</i> -Palmitoleinsäure | 0,96052* |
| C 16:2n-7 c7t9 + Unknown 2 | Hexadecadiensäure (konjugiert) | | 0,88 [#] |
| C 16:2n-6 t8c10 | Hexadecadiensäure (konjugiert) | | 0,92 [#] |
| C 16:2n-7 c7c9 | Hexadecadiensäure (konjugiert) | | 0,9 [#] |
| C 16:2n-7 c6t9 + Unknown 3 | Hexadecadiensäure | | 0,9 [#] |
| C 18:0 | n-Octadecansäure | Stearinsäure | 1,0235 |
| C 18:1n-9 c9 | <i>cis</i> -9-Octadecensäure | Ölsäure | 1,0036 |
| C 18:1n-7 c11 | <i>cis</i> -11-Octadecensäure | Vaccensäure | 0,95 [#] |
| C 18:1n-7 t11 | <i>trans</i> -11-Octadecensäure | <i>trans</i> -Vaccensäure | 0,9692* |
| C 18:2n-6 | <i>cis, cis</i> -9,12-Octadecadiensäure | Linolsäure | 0,99032 |
| C 18:3n-6 | All- <i>cis</i> -6,9,12-Octadecatriensäure | γ-Linolensäure | 0,97325 |
| C 18:3n-3 | All- <i>cis</i> -9,12,15-Octadecatriensäure | | 0,97603 |
| C 18:2n-7 c9t11 | Octadecadiensäure (konjugiert) | „Rumenic acid“ | 0,92764* |
| C 18:2n-6 t10c12 | Octadecadiensäure (konjugiert) | | 0,95944* |
| C 20:0 | n-Eicosansäure | Arachi(di)nsäure | 1,0465 |
| CLA tt | Octadecadiensäure (konjugiert) | | 0,91 [#] |
| C 20:1n-9 c11 | <i>cis</i> -11-Eicosaensäure | Eicosensäure | 1,0092 |
| C 20:1n-7 c13 | <i>cis</i> -13-Eicosaensäure | | 0,97 [#] |
| C 20:1n-7 t13 | <i>trans</i> -13-Eicosaensäure | | 0,99 [#] |
| C 20:2n-6 | <i>cis, cis</i> -11,14-Eicosadiensäure | | 1,0418 |
| C 20:3n-6 | All- <i>cis</i> -8,11,14-Eicostriensäure | Dihomo-γ-Linolensäure | 1,0528 |
| C 20:4n-6 | All- <i>cis</i> -5,8,11,14-Eicosatetraensäure | Arachidonsäure | 1,0512 |
| C 20:3n-3 | All- <i>cis</i> -11,14,17-Eicostriensäure | | 1,0437 |
| C 20:2n-7 c11t13 | Eicosadiensäure (konjugiert) | | 0,99 [#] |
| C 20:2n-6 t12c14 | Eicosadiensäure (konjugiert) | | 1,02 [#] |
| C 20:5n-3 | All- <i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure | EPA | 1,0476* |
| C 22:0 | Docosansäure | Behensäure | 1,1292 |
| C 22:1n-9 c13 | <i>cis</i> -13-Docosaensäure | Erucasäure | 1,118 |
| C 22:2n-6 | <i>cis, cis</i> -13,16-Docosadiensäure | | 1,1115 |
| C 22:4n-6 | All- <i>cis</i> -7,10,13,16-Docostetraensäure | Adrensäure | 1,1 [#] |
| C 22:2n-7 c13t15 | Docosadiensäure (konjugiert) | | 1,04 [#] |
| C 22:2n-6 t14c16 | Docosadiensäure (konjugiert) | | 1,06 [#] |
| C 22:5n-3 | All- <i>cis</i> -7,10,13,16,19-Docosapentaensäure | Clupanodonsäure | 0,99652* |
| C 24:0 | Tetracosansäure | Lignocerinsäure | 1,18 [#] |
| C 22:6n-3 | All- <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure | Cervonsäure oder DHA | 1,0419 |
| C 24:1n-9 c15 | <i>cis</i> -15-Tetracosensäure | Nervonsäure | 1,1588 |
| C 24:1n-9 t17 | <i>trans</i> -15-Tetracosensäure | | 1,14 [#] |
| C 24:2n-6 | <i>cis, cis</i> -15,18-Tetracosadiensäure | | 1,17 [#] |

[#]Anhand der Gesetzmäßigkeit manuell ermittelter RF, * mit Hilfe der Einzelsubstanz ermittelter RF

Supplemental Material

Umrechnungsfaktor: Fettsäuremethylester / Fettsäure

Tab. A2. Faktoren zur Umrechnung des Gehalts von Fettsäuremethylestern in den Gehalt der jeweiligen Fettsäure

| Fettsäure Kurzformel | Molmasse | | Umrechnungsfaktor |
|-------------------------|-----------|-------------|-------------------|
| | Fettsäure | Methylester | |
| 14:0 | 228,38 | 242,41 | 0,942 |
| 16:0 | 256,43 | 270,46 | 0,948 |
| 18:0 | 284,49 | 298,51 | 0,953 |
| 20:0 | 312,53 | 326,56 | 0,957 |
| 22:0 | 340,58 | 354,61 | 0,96 |
| 23:0 | 354,61 | 368,64 | 0,962 |
| 24:0 | 368,64 | 382,66 | 0,963 |
| 16:1 | 254,42 | 268,44 | 0,948 |
| 18:1 | 281,47 | 310,53 | 0,953 |
| 20:1 | 310,53 | 338,58 | 0,957 |
| 22:1 | 338,58 | 366,63 | 0,96 |
| 24:1 | 366,62 | 380,65 | 0,963 |
| 14:2 | 226,36 | 240,38 | 0,942 |
| 16:2 | 252,39 | 266,42 | 0,947 |
| 18:2 | 280,45 | 294,47 | 0,952 |
| 20:2 | 308,50 | 322,53 | 0,957 |
| 22:2 | 336,55 | 350,58 | 0,96 |
| 24:2 | 364,60 | 378,63 | 0,963 |
| 18:3 | 278,43 | 292,46 | 0,952 |
| 20:3 | 306,48 | 320,51 | 0,956 |
| 22:3 | 334,54 | 348,56 | 0,96 |
| 16:4 | 248,36 | 262,39 | 0,947 |
| 20:4 | 304,47 | 318,49 | 0,956 |
| 22:4 | 332,52 | 346,55 | 0,96 |
| 20:5 | 302,45 | 316,48 | 0,956 |
| 22:5 | 330,50 | 344,53 | 0,959 |
| 22:6 | 328,49 | 342,51 | 0,959 |

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die publikationsbasierte Dissertation mit dem Titel „**In vitro-Untersuchungen zum Einfluss von konjugierten Linolsäuren auf kultivierte Pansenepithelzellen vom Schaf als direkt exponiertes Gewebe bei oraler Supplementierung**“ beinhaltet die veröffentlichte Publikation:

Masur, F., F. Benesch, H. Pfannkuche, H. Fuhrmann, und G. Gäbel. 2016. Conjugated linoleic acids influence fatty acid metabolism in ovine ruminal epithelial cells. J. Dairy Sci. 99(4):3081–3095. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10042>.

Die Dissertation wurde angefertigt am Rudolf-Schönheimer-Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät Leipzig (Betreuer: Prof. Dr. med. Torsten Schöneberg) in Zusammenarbeit mit dem Veterinär-Physiologischen Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig (Prof. Dr. med. vet. Gotthold Gäbel) und dem Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig (Prof. Dr. med. vet. Herbert Fuhrmann).

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Unterstützungsleistungen habe ich von folgenden Personen erhalten:

Prof. Dr. med. vet. Gotthold Gäbel, Direktor des Veterinär-Physiologischen Institutes der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig: Konzeption der Studie, Betreuung bei Versuchsplanung, -durchführung sowie Korrektur sämtlicher Manuskripte.

Prof. Dr. med. vet. Herbert Fuhrmann, Direktor des Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institutes der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig: Konzeption der Studie, Betreuung bei den gaschromatographischen Analysen sowie redigierende Funktion bei den Manuskripten.

Prof. Dr. med Torsten Schöneberg, Direktor des Rudolf-Schönheimer-Institutes für Biochemie der Medizinischen Fakultät, Universität Leipzig: Redigierende Funktion bei den Manuskripten.

PD Dr. med. vet. habil. Helga Pfannkuche, Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Veterinär-Physiologischen Institutes der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig: Betreuung bei Versuchsplanung, -durchführung sowie redigierende Funktion beim Manuskript der Publikation.

Dr. med. vet. Franziska Benesch, Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Veterinär-Physiologischen Institutes der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig: Unterstützung bei Versuchsdurchführung sowie Probenaufarbeitung (Zellkultur, RTqPCR).

Ines Urbansky, MTA des Veterinär-Physiologischen Institutes der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig: Unterstützung bei Versuchsdurchführung sowie Probenaufarbeitung (Zellkultur).

Gabriele Dobeleit, MTA des Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institutes der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig: Unterstützung bei Versuchsdurchführung sowie Probenaufarbeitung (Gaschromatographie).

Dr. rer. nat. Dirk K. Wissenbach, Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Institutes für Rechtsmedizin der Medizinischen Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität Jena, zuvor: Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Abteilung Metabolomics des Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung, Leipzig: Unterstützung bei Versuchsdurchführung (GC-MS).

.....
Datum

.....
Unterschrift

Prof. Dr. med. vet. Gotthold Gäbel

Datum, Unterschrift

Prof. Dr. med. vet. Herbert Fuhrmann

Datum, Unterschrift

Prof. Dr. med Torsten Schöneberg

Datum, Unterschrift

PD Dr. med. vet. habil. Helga Pfannkuche

Datum, Unterschrift

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....
Datum

.....
Unterschrift

Publikationen und Vorträge im Rahmen der Dissertation

Publikationen:

Masur, F., F. Benesch, H. Pfannkuche, H. Fuhrmann, und G. Gäbel. 2016. Conjugated linoleic acids influence fatty acid metabolism in ovine ruminal epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 99(4):3081–3095. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10042>.

Benesch, F., F. Dengler, **F. Masur**, H. Pfannkuche, und G. Gäbel. 2014. Monocarboxylate transporters 1 and 4: expression and regulation by PPAR α in ovine ruminal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307(12):R1428-1437. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00408.2013>.

Poster:

25. Kongress der EITG 2013 in Bad Herrenalb: „Effects of CLA in gene expression and fatty acid metabolism of ovine ruminal epithelial cells”

Vorträge:

Arbeitsgruppentreffen Hannover-Leipzig 2013 in Hannover: „Auswirkungen von konjugierten Linolsäuren (CLA) und Vaccensäure auf die Genexpression und den Fettsäuremetabolismus von kultivierten Pansenepithelzellen des Schafes“

21. DVG Tagung 2014 in Zürich: „Konjugierte Linolsäuren und strukturverwandte Fettsäuren im Pansenepithel des Schafes – Folgen einer Anreicherung“

68. Tagung der GfE 2014 in Göttingen: „Enrichment and effects of conjugated linoleic acids and structurally related fatty acids in ovine rumen epithelium“

Kolloquium im Rahmen des Zentrums für Veterinärmedizinische Grundlagenwissenschaften 2014/2015 in Leipzig: „Haben konjugierte Linolsäuren (CLA) und strukturverwandte Fettsäuren einen Einfluss auf das Pansenepithel?“

Teilnahmen:

67. Tagung der GfE 2013 in Göttingen

Arbeitsgruppentreffen Hannover-Leipzig 2014 in Leipzig

4. Symposium der Jungen Physiologen der DPG 2015 in Leipzig